

Міністерство освіти і науки України  
Національний технічний університет України  
«Київський політехнічний інститут ім. Ігоря Сікорського»

На правах рукопису

ЛЕВТУН ІГОР ІГОРОВИЧ

УДК 57.043: 57.044: 620.951

**БІОТЕХНОЛОГІЯ КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРОВОДОРОСТЕЙ  
*CHLORELLA VULGARIS* З ПІДВИЩЕНИМ ВМІСТОМ ЛІПІДІВ**

03.00.20 – біотехнологія

Дисертація на здобуття наукового ступеня  
кандидата технічних наук

Науковий керівник:  
док.техн.наук, ст. наук. сп.  
доц.  
Голуб Н.Б.

**Київ – 2017**

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	5
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1 АНАЛІЗ СУЧАСНОГО СТАНУ КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРОВОДОРОСТЕЙ ДЛЯ ОТРИМАННЯ БІОДИЗЕЛЬНОГО ПАЛИВА .....	13
1.1 Кількісний та якісний вміст ліпідів у культурі <i>Chlorella vulgaris</i> .....	13
1.2 Вплив ультразвукового опромінення на метаболізм клітин.....	14
1.2.1 Вплив ультразвукового опромінення на розвиток бактерій.....	14
1.2.2 Інтенсифікація ультразвуком метаболізму насіння.....	16
1.2.3 Вплив ультразвукового опромінення на розвиток грибів.....	17
1.2.4 Використання ультразвуку для генетичної модифікації.....	19
1.2.5 Водорості.....	20
1.3 Вплив складу середовища на культивування мікроводоростей... ..	21
1.4 Вплив параметрів освітлення на розвиток мікроводоростей.....	27
1.5 Вплив температури на процес культивування мікроводоростей.....	32
Висновки до розділу.....	33
РОЗДІЛ 2 ВИБІР НАПРЯМКІВ ТА МЕТОДИК ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	35
2.1 Вибір напрямків досліджень.....	35
2.2 Культивування мікроводоростей.....	36
2.2.1 Мікроводорості виду <i>Chlorella vulgaris</i> .....	37
2.2.2 Склад поживного середовища.....	38
2.2.3 Устаткування для культивування мікроводоростей.....	39
2.2.3.1 Лабораторна установка для нарощування біомаси.....	39
2.2.3.2 Система освітлення.....	42
2.2.4 Обладнання для опромінення хвилями різної частоти.....	43
2.2.5 Установка для дослідження впливу довжини хвилі світла.....	45
2.2.6 Визначення приросту біомаси та розмірів клітин.....	46

2.2.7	Методика визначення складу жирних кислот та кількості ліпідів у біомасі мікроводоростей.....	48
2.2.8	Визначення вмісту хлорофілів <i>a</i> та <i>b</i> .....	49
2.2.9	Математична обробка одержаних даних і оцінка похибок.....	50
	Висновки до розділу.....	51
	РОЗДІЛ 3 ВПЛИВ ОПРОМІНЕННЯ РІЗНОЇ ЧАСТОТИ НА РІСТ ТА РОЗВИТОК МІКРОВОДОРОСТЕЙ <i>CHLORELLA VULGARIS</i>	52
3.1	Вплив опромінення частотами звукового діапазону.....	53
3.2	Вплив опромінення ультразвукового спектру на розвиток клітин <i>Chlorella vulgaris</i> та біосинтез ліпідів.....	60
	Висновки до розділу.....	67
	РОЗДІЛ 4 ДІЯ ЧАСТОТ ВИДИМОГО СПЕКТРУ НА РІСТ ТА РОЗВИТОК МІКРОВОДОРОСТЕЙ <i>CHLORELLA VULGARIS</i>	69
4.1	Вплив штучного опромінення частотами видимого спектру.....	70
4.2	Визначення раціонального співвідношення світлодіодів синього, червоного та зеленого спектрів для одержання максимального приросту біомаси <i>Chlorella vulgaris</i> .....	77
	Висновки до розділу.....	82
	РОЗДІЛ 5 ВПЛИВ ДЖЕРЕЛА НІТРОГЕНУ НА РОЗВИТОК МІКРОВОДОРОСТЕЙ <i>CHLORELLA VULGARIS</i> .....	84
5.1	Вплив джерела нітрогену на приріст біомаси <i>Chlorella vulgaris</i> .....	85
5.2	Вплив хімічних та фізичних параметрів на біосинтез ліпідів <i>Chlorella vulgaris</i> .....	89
	Висновки до розділу.....	95
	РОЗДІЛ 6 ТЕХНОЛОГІЧНІ РІШЕННЯ ДЛЯ ОТРИМАННЯ БІОДИЗЕЛЬНОГО ПАЛИВА З МІКРОВОДОРОСТЕЙ...	97
6.1	Обґрунтування технології культивування мікроводоростей <i>Chlorella vulgaris</i> .....	98

6.2 Технологічний процес одержання енергоносіїв з мікрводоростей	
<i>Chlorella vulgaris</i> .....	103
Висновки до розділу.....	115
ВИСНОВКИ .....	117
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	120
Додатки.....	137

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ККД - коефіцієнт корисної дії

SAAT - Sonication Assisted Agrobacterium-mediated Transformation

ЕДТА – Етилендіамінтертауксусна кислота

ДНК – Дезоксирибонуклеїнова кислота

РНК – Рибонуклеїнова кислота

АТФ – Аденин три фосфат

## ВСТУП

**Актуальність роботи.** Щорічно в Україні споживається близько 200 мільйонів тонн умовного палива, при цьому видобуток з природних джерел країни становить лише 80 млн. тонн [1]. При такому балансі власної та імпортованої енергетичної сировини важливим потенційним ресурсом може стати біопаливо. Останнім часом у світі широко проводяться дослідження та розробки технологій виробництва біопалива, джерелом якого є водорості.

Продуктивність водоростей набагато більша, ніж будь-яких сільськогосподарських культур. Вони характеризуються високим коефіцієнтом корисної дії (ККД) використання світла [2, 3]. При застосуванні сучасних технологій культивування мікроводоростей ККД перетворення енергії світла в процесі фотосинтезу в їх клітинах досягає  $8 \div 10\%$  (наземні рослини –  $0,5\%$ ) [4]. Як наслідок такого високого ККД мікроводорості мають більш високі врожаї біомаси з гектару, більшу швидкість росту ( $1 \div 3$  подвоєння клітин/доба) ніж клітини вищих рослин. Перевагою біотехнологій за використання як продуцента є також і те, що при контрольованому культивуванні практично немає втрат біомаси.

Клітини мікроводоростей синтезують біоенергетичну сировину - ліпіди, які за допомогою стандартних технологічних процесів можуть бути перероблені у біодизельне паливо – замітник дизельного пального з нафти [4]. Загальний вміст ліпідів у клітинах водоростей коливається у значному діапазоні. У синьо-зелених водоростей в залежності від виду -  $2 \div 18\%$  від сухої біомаси, у жовто-зелених -  $5 \div 10\%$ , у деяких зелених може досягати  $37,3\%$ , у діатомових -  $35\%$ , у генномодифікованих водоростей роду *Nannochloropsis* може сягати до  $70\%$  [5, 6]. При цьому кількість та якісний склад ліпідів залежить від умов технологічного процесу культивування мікроводоростей [1 – 6].

Дослідженням з даного напрямку займалися: Becker E.W., Chen C.Y., Choi B., Chisti Y., Harwood J.L., Золотарьова О.К., Упитис В.В. та інші.

Було з'ясовано, що процес продукування біомаси перебігає краще за оптимальних умов культивування, а біосинтез підвищеного вмісту ліпідів у клітинах - за умов незбалансованості живильного середовища або за стресових умов. Тому створення максимально ефективних для накопичення ліпідів стресових умов одночасно з високим виходом біомаси є актуальною проблемою для розробки технологій культивування мікробіодоростей з метою одержання біодизельного палива [5 – 8].

Для створення стресових умов необхідно обирати легко контрольовані чинники, що дають стійкий результат. З відомих методів підвищення виходу ліпідної фракції найбільш ефективними вважаються хімічні методи, тобто регуляція вмісту поживних речовин, нестача або надлишок яких призводить до накопичення ліпідів [5, 6]. Використання хімічних методів у комбінації з фізичними може посилити їх вплив на метаболізм мікробіодоростей і збільшити вихід ліпідів [4].

Ультразвукове опромінення завдяки своїй фізичній та фізіологічній дії може бути потенційно ефективним та легко контрольованим стресовим фактором. На теперішній час відсутні дані щодо впливу ультразвукового опромінення на мікробіодорості. Виходячи з результатів досліджень дії ультразвукового опромінення на інші види одноклітинних організмів, можна вважати, що вплив ультразвуку буде подібним і для мікробіодоростей [7]. Тому актуальним є детальне дослідження дії ультразвукового опромінення на зміну метаболізму мікробіодоростей.

Також відомим, але малодослідженим фактором, що потребує обґрунтування, є вплив комбінації довжин хвиль світлового опромінення на розвиток культури мікробіодоростей [4]. Відомо, що мікробіодорості *Chlorella vulgaris* потребують освітлення різними діапазонами хвиль. Зміна комбінації довжин хвиль та їх інтенсивність повинна впливати на ефективність фотосинтезу та накопичення ліпідної фракції [1]. Тому дослідження впливу комбінації діапазонів довжин хвиль видимого спектру на розвиток *Chlorella vulgaris* є актуальною проблемою.

Використання комбінації перерахованих фізичних впливів може значно збільшити вихід ліпідної фракції і, як наслідок, біодизельного палива. Тому обґрунтування та дослідження раціональних параметрів процесу культивування *Chlorella vulgaris*, що призводить до підвищеного біосинтезу ліпідної фракції, є актуальною проблемою, вирішенню якої присвячена робота.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційну роботу виконано на кафедрі екобіотехнології та біоенергетики Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут». Тематика дисертаційної роботи відповідає пріоритетним напрямкам розвитку науки і техніки «Раціональне природокористування» та стратегічним пріоритетним напрямкам інноваційної діяльності в Україні на 2010 – 2020 роки: «Вдосконалення хімічних технологій, нові матеріали, розвиток біотехнологій». Роботу виконано за темами кафедри екобіотехнології та біоенергетики: «Фотобіоелектрохімічна конверсія відходів і біосировини з одержанням електричної енергії та енергоносіїв», № ДР 0113U001650 (2013 – 2014 р.), виконавець; «Отримання енергоносіїв з відходів виробництва біодизельного палива, промислових стоків, мікроводорості *Chlorella vulgaris* та відходів її культивування», № ДР 0115U000399 (2015 – 2016 р.), виконавець.

**Мета і задачі дослідження.** Метою роботи є розробка технологічних рішень культивування *Chlorella vulgaris* з підвищеним вмістом ліпідів, як сировини для одержання біодизельного палива.

Для досягнення мети передбачено виконання таких задач:

- спроектувати та сконструювати експериментальну лабораторну установку для дослідження впливу світлового та ультразвукового опромінення;
- встановити вплив звукових коливань різної частоти на динаміку приросту біомаси та продукування ліпідів культурою мікроводоростей *Chlorella vulgaris*;



- дослідити вплив низькочастотного ультразвукового опромінення на розвиток мікроводоростей та продукування ліпідів *Chlorella vulgaris*;
- визначити вплив співвідношення різних довжин хвиль світлового опромінення та їх інтенсивності на розвиток культури *Chlorella vulgaris*;
- дослідити одночасний вплив джерела нітрогену, освітлення хвилями різної довжини опромінення ультразвуком на приріст біомаси та ліпідів *Chlorella vulgaris*;
- обґрунтувати та визначити раціональні параметри процесу культивування мікроводоростей *Chlorella vulgaris* з підвищеним вмістом ліпідів у клітинах;
- розробити технологічну і апаратурну схеми культивування мікроводоростей для одержання з них біодизельного палива.

**Об'єкт дослідження.** Процес культивування мікроводорості *Chlorella vulgaris* з підвищеним вмістом ліпідів для одержання біодизельного палива.

**Предмет дослідження.** Раціональні параметри процесу культивування *Chlorella vulgaris* за використання комбінації ультразвукового та світлового опромінення хвилями різної довжини.

#### **Методи дослідження**

Для спостереження за формуванням колоній мікроводоростей, зміною забарвлення та розмірів клітин, їх підрахунку застосовували метод мікроскопії. Для дослідження динаміки приросту біомаси та вмісту хлорофілів використовували спектрофотометричний метод аналізу. Для визначення кількості біомаси мікроводоростей та ліпідів застосовували ваговий метод. Для виділення ліпідів з біологічного матеріалу використовували метод Сокслета, для визначення якісного складу ліпідної фракції – хроматографічний метод. Графічне оформлення даних та обробку результатів досліджень здійснено за допомогою програмного забезпечення MS Excel. Креслення схем виконано за допомогою програмного забезпечення “Аскон Компас”.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Основні положення дисертаційних досліджень, які визначають наукову новизну одержаних результатів:

- вперше визначено вплив низькочастотного ультразвукового опромінення на процес культивування мікроводоростей *Chlorella vulgaris*, що дозволило встановити раціональні довжини хвиль для підвищеного біосинтезу ліпідної фракції (триацилгліцеролів);

- вперше визначено необхідні діапазони хвиль світлового опромінення та їх співвідношення для культивування *Chlorella vulgaris*, що дало змогу підвищити вихід біомаси мікроводоростей та ліпідної фракції;

- вперше встановлено синергічний вплив хімічних (джерело нітрогену) та фізичних (ультразвукове опромінення, освітлення) факторів, що дало змогу встановити раціональні параметри процесу культивування мікроводоростей *Chlorella vulgaris* з підвищеним вмістом триацилгліцеролів;

- дістало подальший розвиток визначення впливу джерел нітрогену та їх комбінацій на метаболізм *Chlorella vulgaris*, що дало можливість підвищити вихід ліпідів за сумісної дії іонів амонію та сечовини.

**Практичне значення одержаних результатів.** Практичне значення роботи полягає у вирішенні актуальної проблеми суспільства - заміни традиційних енергоносіїв відновлювальними екологічно чистими джерелами енергії. Одержано такі практичні результати:

- визначені раціональні параметри біотехнологічного процесу культивування мікроводорості *Chlorella vulgaris* дозволяють підвищити вміст ліпідної фракції у клітинах до 55% без зниження приросту біомаси, що дає змогу їх використання як сировини для отримання біодизельного палива. Одночасно відбувається утворення високоякісного добрива. На підприємстві ТОВ «Авангард» Жашківського району Черкаської області проведено дослідно-промислове випробування біотехнології культивування *Chlorella vulgaris* з підвищеним вмістом ліпідів (Акт впровадження від 06.09.2016 р.);

- запропоноване використання комбінації світлодіодів з хвилями різної довжини для освітлення та опромінення ультразвуковими хвилями низької частоти дає змогу підвищити вихід біомаси мікродоростей у 3 ÷ 4 рази та вміст ліпідів, що знижує енергетичні витрати на процес культивування.

Результати проведених досліджень впроваджено у навчальний процес підготовки фахівців за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія» спеціалізації «Екологічна біотехнологія та біоенергетика» при підготовці дисциплін «Водорості в біоенергетиці» та «Переробка біомаси» (Акт впровадження від 08.09.2016 р.).

**Особистий внесок здобувача.** Всі основні результати дисертаційної роботи отримано здобувачем особисто. Внесок дисертанта включає: розробку та конструювання лабораторної установки культивування мікродоростей з можливістю регулювання подачі вуглекислого газу, терміну освітлення, температури, швидкості перемішування барботажем повітрям; конструювання системи освітлення комбінаціями світлодіодів, системи опромінення хвилями різної частоти; проведення експериментів з культивування мікродоростей під дією змінних фізичних та хімічних факторів (джерело нітрогену, ультразвукове опромінення, освітлення); визначення оптичної густини суспензії та спостереження за культурою; створення технологічних та апаратурних схем процесів.

**Апробація результатів дисертації.** Матеріали дисертації були представлені на щорічних конференціях: XIII-XV міжнародних науково-практичних конференціях «Відновлювана енергетика XXI століття». – Крим, 2012 (10–14 вересня), Крим, 2013 (16–20 вересня), Київ, 2014 (16–17 вересня), XVI – XVII міжнародних науково-практичних конференціях «Відновлювана енергетика та енергоефективність XXI століття». – Київ, 2015 (28–29 травня), Київ, 2016 (29–30 вересня); XV міжнародній науково-практичній конференції студентів, аспірантів і молодих учених «Екологія. Людина. Суспільство», Київ, 2012 (26–30 вересня); Міжнародній науково-практичній конференції «Новітні досягнення біотехнології та нанофармакології», Київ, 2015 (22–23

жовтня); IX–X Всеукраїнських науково-практичних конференціях «Біотехнологія XXI століття», Київ, 2015 (24 квітня), Київ, 2016 (22 квітня).

### **Публікації**

За темою дисертації опубліковано 20 наукових праць, з них 5 наукових статей у фахових виданнях, (з них 1 – у виданні іноземних держав, 2 статті у фахових виданнях України, що входять до міжнародних наукометричних баз); 1 патент України на винахід; 1 патент України на корисну модель; 13 тез доповідей на конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, 6 розділів, висновків, списку використаних джерел та додатків. Викладена на 119 сторінках, містить 30 рисунків, 8 таблиць, 149 найменувань літературних джерел, 4 додатки на 17 сторінках.

# РОЗДІЛ 1

## АНАЛІЗ СУЧАСНОГО СТАНУ КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРОВОДОРОСТЕЙ ДЛЯ ОТРИМАННЯ БІОДИЗЕЛЬНОГО ПАЛИВА

### 1.1 Кількісний та якісний вміст ліпідів у культурі *Chlorella vulgaris*

Вміст різних біологічних макромолекул у сухій масі мікроводоростей може змінюватись у наступних межах: білки 51 ÷ 58%, вуглеводи 12 ÷ 17%, ліпіди 11 ÷ 43%. Показано, що за нормальних умов *Chlorella vulgaris* може містити ліпідів у сухій біомасі від 11,5% до 28 ÷ 43% у спеціалізованих штамів [1,4].

Якісний і кількісний склад жирних кислот є різноманітним у різних видів мікроводоростей. Зелені водорості здебільшого мають подібний до вищих рослин склад жирних кислот з домінуванням C16 і C18, як насичених, так і ненасичених. Загальна кількість ненасичених жирних кислот у ліпідах мікроводоростей значно вища, ніж у пальмової олії, але поступається соєвій олії. Основні жирні кислоти, що використовуються для виробництва біодизельного палива, представлені у зелених мікроводоростях у виді C16, C18 і C20 сполук: пальмітинова та олеїнова жирні кислоти [8]. Кількість ненасичених жирних кислот робить паливо більш нестабільним та прискорює процес окиснення, що зменшує енергетичну цінність палива і термін його зберігання [8].

За даними, наведеними у роботах [9 – 13], накопичення триацилгліцеролів є реакцією відповіді мікроводоростей на несприятливі умови культивування. Накопичення ліпідів у водоростей відбувається зазвичай у період стресу та при дефіциті поживних речовин. При цьому метаболізм змінюється в бік підвищення акумуляції нейтральних ліпідів у вигляді триацилгліцеролів, які не виконують структурних функцій, а є формою запасання вуглецю та енергії [10]. Можливість керування якісним та

кількісним складом цільових продуктів внаслідок направленої зміни метаболізму шляхом варіювання параметрів біотехнологічного процесу культивування мікроводоростей являється вагомою перевагою мікроводоростей перед сільськогосподарськими олійними культурами [10 – 14].

Цілком імовірно, що в цих організмах роль триацилгліцеролів не обмежується традиційною для них функцією зберігання енергії. Численні дані свідчать, що триацилгліцероли мікроводоростей більше, ніж просто резервуар багатих енергією молекул; вони активно беруть участь у процесах адаптації до стресових умов навколишнього середовища [14 – 16].

## 1.2 Вплив ультразвукового опромінення на метаболізм клітин

Ультразвукове опромінення високими частотами (40 ÷ 1146 кГц) широко застосовується для пригнічення росту і руйнування оболонок мікроводоростей і, як наслідок, для відділення олій за допомогою явища кавітації [17].

Ультразвукове опромінення частотою 28 кГц, потужністю 120 Вт, тривалістю 3 – 30 с використовується для очищення стінок фотобіореакторів від мікроводоростей [18].

### 1.2.1 Вплив ультразвукового опромінення на розвиток бактерій

Ультразвукове опромінення широко використовується для інгібування росту ціанобактерій, але при такому інгібуванні спостерігається збільшення вмісту ліпідів, що доводить можливість використання ультразвукового опромінення як стресового фактора з метою підвищеного біосинтезу ліпідів. Це підтверджується дослідженням (Ahn C.Y., 2003), у якому визначали можливість ультразвукового опромінення інгібувати ріст ціанобактерій *Microcystis aeruginosa* UTEX 2388 [19]. При тривалій дії ультразвукового

опромінення частотою 20 кГц (600 Вт) та 200 кГц (100 Вт) спостерігали збільшення розмірів клітин, вмісту хлорофілу та ліпідної фракції в них вже через 4 години після опромінення, через 72 години майже всі клітини були зруйновані внаслідок кавітації та утворення вільних радикалів. Хоча ціллю даного дослідження було знищення ціанобактерій, результати показали, що на початкових стадіях розвитку клітин після опромінення відбувається збільшення вмісту хлорофілу *a* та ліпідної фракції. При тривалому опроміненні спостерігається руйнування мембран і загибель клітин [19].

Досліджено можливість використання ультразвукового опромінення для інтенсифікації метаболізму пропіонових бактерій [20]. Опромінення ультразвуком частотою 20 кГц протягом 10 хвилин кожні 24 години збільшує проникність мембрани і, як наслідок, зростає рівень накопичення поживних речовин, що відповідно інтенсифікує метаболізм пропіонових бактерій. Це призводить до збільшення швидкості росту та накопичення біомаси.

У дослідженні (Silke Jachlewski, 2013), показано, що вплив ультразвукового опромінення на ціанобактерії *M. aeruginosa*, що містять газові вакуолі, і тих, що не містять, може відрізнятись [21]. Показано, що при безперервному опроміненні протягом 9 діб частотою 256 кГц, вже на 1 добу клітини, що містили вакуолі, були пошкоджені. Ультразвукове опромінення призвело до їх деформації, у деяких клітин спостерігали розриви вакуоль. На 9-ту добу усі клітини з вакуолями та без них були зруйновані. Встановлено, що швидкість руйнування клітин, які містили вакуолі була більшою, ніж у тих, які їх не містили. Це пояснюється тим, що для руйнування зовнішньої мембрани необхідно більше часу, ніж на руйнування мембран вакуолей. Також було показано, що частоти 20 кГц, 80 кГц, 150 кГц (130 Вт) мають менший вплив на вакуолі і не призводять до швидкої загибелі клітини [21].

Таким чином, вплив ультразвукового опромінення на клітини бактерій залежить від структури клітини, частоти, інтенсивності та тривалості дії і, відповідно, в залежності від умов може призводити або до зміни метаболізму прискорюючи біосинтетичні процеси, або до руйнуванню мембран і загибелі

культури.

### 1.2.2 Інтенсифікація ультразвуком метаболізму насіння

Ультразвук також застосовують для інтенсифікації метаболізму насіння вищих рослин. Дослідження показали, що використання ультразвуку частотою 20 кГц протягом періодів у 5, 10, 15 хвилин призводить до збільшення ензиматичної активності у клітинах зародку рослини в насініні майже в 2 рази при опроміненні протягом 10 хвилин, при опроміненні протягом 15 хвилин активність знижується на 3 ÷ 6%. Збільшення частоти ультразвуку призводить до збільшення активності альфа-амілази на 20%, що підвищує швидкість метаболізму внаслідок інтенсифікації використання крохмалю в насініні [22]. При застосуванні ультразвуку для активації насіння було встановлено, що опромінення частотою 42 кГц протягом періоду від 0,5 до 3 хвилин призводить до прискорення метаболізму і більшої на 20% швидкості росту по відношенню до необроблених зразків [23].

У дослідженнях (Nihal E. Al-Taee, 2013), насіння вищих рослин, на прикладі сезаму, було встановлено, що використання ультразвуку призводить до збільшення ензиматичної активності ферментів таких як: тиміділат синтази, дигідрофолат редуктази, гідроксиметил трансферази, прискоренню синтезу нуклеїнових кислот та підвищенню вмісту протеїнів у клітинах [24]. При використанні частоти 50 кГц протягом 40 хвилин синтез протеїнів збільшується майже в 5 разів по відношенню до контрольного зразку, вміст РНК та ДНК в клітинах - до 10 разів, біомаса калусних клітин - у 3 рази. Також показано, що при опроміненні частотою 50 кГц протягом 70 хвилин стимулюючий ефект втрачається і відбувається загибель клітин [24].

Таким чином, обробка насіння ультразвуком призводить до інтенсифікації розвитку рослин, підвищенню активності ферментів та біосинтезу органічних речовин, і, відповідно, до збільшення врожаю.



### 1.2.3 Вплив ультразвукового опромінення на розвиток грибів

Дослідження впливу ультразвукового опромінення низької частоти на процес ферментації дріжджів, проведене (Klomklieng W., 2012), показали, що опромінення частотами  $20 \div 30$  кГц культури дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* M30 призводить до збільшення кількості етанолу, який утворюється внаслідок бродіння. Максимальний вміст етанолу 15,6% спостерігали при дії ультразвуку частотою 25 кГц, вміст у контрольному зразку – 11% [25]. За використання частоти 30 кГц, зазвичай, спостерігається зменшення виходу етанолу внаслідок пошкодження мембран клітин. Також було показано, що збільшення температури компенсує негативний вплив такої частоти і дозволяє досягти виходу етанолу 12% [25]. Ультразвук також використовували для активації дріжджів *Saccharomyces vini*. Попередня обробка клітин дріжджів ультразвуком з густиною звукової енергії  $15 \cdot 10^3 \div 20 \cdot 10^3$  кДж/м<sup>3</sup>, частотою 22 кГц протягом  $3 \div 5$  хвилин підвищує приріст біомаси в  $2,8 \div 3$  рази [26].

Дослідження, проведені (Chuanyun D., 2003), показали, що ультразвукове опромінення впливає на швидкість синтезу рибофлавіну та швидкість росту міцелію у *Ecemothecium ashbyii*. Після короткочасного опромінення ультразвуком частотою 24 кГц культури, яке проводили кожні 24 години, термін культивування, необхідний для нарощування біомаси до її максимальної концентрації у середовищі, скоротився на 36 годин порівняно з нормальними умовами. При цьому вихід рибофлавіну підвищується у 5 разів. Такі результати свідчать про здатність ультразвукового опромінення змінювати як метаболізм клітин, так і інтенсифікувати біосинтетичні процеси [27].

Короткотривале ультразвукове опромінення низької частоти клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* (K-7) призводить до збільшення швидкості метаболізму внаслідок підвищення проникності мембрани [28].

Дія ультразвукового опромінення високих частот  $300$  кГц  $\div$   $2$  МГц може мати стимулюючий ефект на ріст та розвиток культури. Було показано, що при

короткотривалому опроміненні дріжджів спостерігається ефект подібний для дії низьких частот, але дозволяє зменшити витрати енергії на опромінення [29]. Дія частот в діапазоні 30 кГц ÷ 2,4 МГц на дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* (K-7) в експонентній фазі росту призводить до значного збільшення біомаси, в той час як дія у стаціонарній фазі не впливає на розвиток клітин і приріст біомаси не відрізняється від стандартних умов. Максимальний вихід біомаси та продукту бродіння етанолу спостерігали при дії частоти 2,4 МГц за умови нагрівання середовища до 30 °С, без нагрівання дія таких частот опромінення призводить до загибелі клітин дріжджів [28].

Ahmad Ziad Sulaiman зі співавторами (2011), показав, що ультразвукове опромінення протягом 1 с з інтервалом у 10 с має стимулюючий ефект на ферментативне продукування біоетанолу культурою дріжджів *Kluveromyces marxianus* (ATCC 46537) [30]. Також у роботі показано, що короткочасний періодичний вплив ультразвукового опромінення призводить до збільшення проникності мембран клітини для протеаз та позитивних іонів, зокрема іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , за зміною концентрації яких встановлювали проникність мембран. При терміні опромінення у 2 с з періодом 5 с при частоті 20 кГц (потужність елемента 550 Вт на 40 літрів об'єму) вміст біомаси підвищується у 2,8 рази по відношенню до контрольного зразку, а вихід етанолу стає майже в 4 рази більшим. При збільшенні періоду опромінення до 5 с. спостерігалась загибель клітин і, як наслідок, менший в 2 рази вихід біомаси [30].

У роботі [31] показано, що короткотривале опромінення високими частотами 1 ÷ 10 МГц має більш м'яку дію, ніж опромінення частотами 20 ÷ 100 кГц. Збільшення терміну дії до 1 хвилини частоти 2,2 МГц при потужності 14 Вт руйнує 25% клітин *S. cerevisiae*, подальше збільшення часу опромінення призводить до повної загибелі культури.

Anderson J.M. зі співавторами (1953), встановив інгібуючий ефект ультразвукового опромінення при безперервному застосуванні частот 20 кГц – 1 МГц на розвиток дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Показано, що швидкість та інтенсивність загибелі клітин залежить від потужності та частоти

опромінення. Так, безперервне опромінення частотами 20 – 100 кГц призводить до більш швидкої загибелі клітин дріжджів ніж при короткочасному опроміненні більш високими частотами. Це пояснюється тим, що коливання частот до 100 кГц впливають на мембрани внаслідок більшого періоду ультразвукової хвилі, і, відповідно, краще вловлюється мембранами, ніж хвиля з меншим періодом [32].

Тобто, використання раціональних параметрів ультразвукового опромінення дріжджів внаслідок зміни проникності мембран прискорює розвиток культури і підвищує вихід цільового продукту.

#### 1.2.4 Використання ультразвуку для генетичної модифікації

Ультразвукове опромінення використовується в генетичній інженерії як метод трансфекції. Підвищена проникність мембран, що виникає внаслідок опромінення клітин ультразвуком, дозволяє фрагментам нуклеїнових кислот з зовнішнього середовища потрапити всередину клітини і потім в ядро.

Так, у дослідженнях [33, 34] встановлено, що використання ультразвукового опромінення підвищує проникність мембран клітин для носіїв фрагментів нуклеїнових кислот. При цьому використання ультразвукового опромінення підвищує ефективність генетичної трансфекції *HerG2* у 14 разів для піддослідної культури дріжджів. Так, проникність мембран для плазмід з носіями зростає до 50% при обробці культури ультразвуком частотою 20 кГц протягом декількох хвилин [35].

Використання ультразвуку для генетичної модифікації потребує також специфічних носіїв для фрагментів нуклеїнових кислот і тим самим запобігає проникненню частинок нуклеїнових кислот з зовнішнього середовища, які не зв'язані з носієм. На цьому принципі основана технологія SAAT (Sonication Assisted Agrobacterium-mediated Transformation) для модифікації вищих рослин [34].

Вплив ультразвукового опромінення частотами 20 кГц ÷ 2 МГц призводить до збільшення швидкості синтезу ДНК [36]. При використанні високих частот (2 МГц) за довготривалого опромінення спостерігали фрагментацію ДНК досліджуваних клітин, що пояснюється ефектом гомогенізації речовин під дією високих частот.

У роботі [37] досліджено вплив ультразвукового опромінення високої частоти на клітини вищих рослин. За допомогою полімеразної ланцюгової реакції встановлено, що при короткочасному (менше 10 хв.) опроміненні високими частотами генетичні зміни не виникають. Аномальні зміни у рослинах, що обробляли ультразвуком тривалий час (30 хв.), характеризуються виникненням деформованого листа, порушенням пігментації, укороченням прожилок. На клітинному рівні спостерігали значне пошкодження мембран і загибель 25% клітин. Хоча можливість виникнення таких змін і може бути пов'язана зі змінами в генетичному матеріалі, клітинне дослідження свідчить про значне пошкодження мембран, що найімовірніше і призводить до морфологічних змін. Також опромінення довше 10 хвилин призводить до незначних (в межах 5%) відхилень в генетичному матеріалі, що може бути пояснене пошкодженням мембран клітин.

Таким чином, ультразвукове опромінення потенційно може впливати на структуру ДНК клітин, але пошкодження мембран, що відбувається під дією опромінення, призводить до загибелі клітини набагато раніше, ніж виникнення генетичної зміни.

### 1.2.5 Водорості

Виходячи з розглянутого вище матеріалу, можна констатувати, що ультразвукове опромінення може використовуватись як для зміни метаболізму мікроорганізмів в бік утворення певних продуктів, так і для їх знешкодження. Вплив ультразвукового опромінення на клітини мікрободоростей не досліджено. Дія ультразвукового опромінення на клітини мікрободоростей

може призвести до змін у їх метаболізмі в бік підвищеного біосинтезу ліпідів, у тому числі триацилгліцеролів – сировини для отримання біодизельного палива.

Тому визначення впливу параметрів (довжини хвилі, терміну обробки, потужності) опромінення ультразвуковими частотами на зміну метаболізму мікроводоростей в бік утворення ліпідів (триацилгліцеролів) є однією з задач даної роботи.

### 1.3 Вплив складу середовища на культивування мікроводоростей

Для розвитку та розмноження клітин мікроводоростей необхідно вносити в живильне середовище елементи, за допомогою яких відбувається біосинтез речовин, функціонування та оновлення клітин.

Усі живильні середовища, що розроблені для вирощування мікроводоростей, містять Карбон, Нітроген, Фосфор, Сульфур, Калій, Магній, Ферум, Цинк, Манган, Купрум, Молібден [38 – 40].

*Карбон.* Фотоавтотрофні організми можуть конвертувати як неорганічні, так і органічні джерела карбону. Представники відділу зелених водоростей *Chlorella* sp. можуть використовувати CO<sub>2</sub> в умовах освітлення і деякі форми органічного карбону у темряві [38].

В роботі [41] показано, що штам *Chlorella vulgaris* UAM 1011, який виділено зі стічної води виробництва цукру, дає найвищий приріст біомаси у 3,16 мг/доба при вирощуванні з додаванням як CO<sub>2</sub> (10 ÷ 30 мкмоль/дм<sup>3</sup>), так і глюкози (28 ÷ 45 ммоль/дм<sup>3</sup>). За використання тільки CO<sub>2</sub> приріст складає 1,95 мг/доба, за використання тільки глюкози при культивуванні в темряві – 1,20 мг/доба. При вирощуванні на глюкозі знижується інтенсивність фотосинтезу на 12 ÷ 26% завдяки активізації процесів дихання.

*Нітроген.* Забезпеченість клітин нітрогеном визначає процеси біосинтезу. Виключення нітрогену з живильного середовища призводить до уповільнення темпів росту з наступною повною зупинкою біосинтезу. Для

хлорели при азотному голодуванні знижується синтез білку і підвищується синтез вуглеводів та ліпідів. При цьому ліпіди у мікрowodоростях можуть накопичуватись до  $50 \div 80\%$  від сухої маси [42]. При регулюванні терміну вирощування у середовищі зі зниженим вмістом нітрогену можливо здійснювати направлений біосинтез речовин. Як джерело нітрогену використовують нітрат калію; сульфат, нітрат і бікарбонат амонію; сечовину; амінокислоти [43].

Більшість фотосинтетичних водоростей можуть рости, використовуючи іони нітрату або амонію. У деяких видів амонійний нітроген споживається першочергово, оскільки  $\text{NH}_4^+$  є кінцевим продуктом відновлення нітрату. Однак, багато видів водоростей чутливі до  $\text{NH}_4^+$  і їх ріст уповільнюється за концентрації, що перевищує  $1 \text{ ммоль/дм}^3$  [43]. У роботах [43,44] досліджено вплив різних джерел нітрогену ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , сечовини) на зростання мікрowodорості *Scenedesmus* sp. LX1 та *Chlorella vulgaris*. Показано, що споживання нітрогену у формі нітрату та сечовини позитивно впливає на приріст біомаси водоростей, в той час як іони амонію інгібують розвиток культур внаслідок зміни значення рН середовища.

У роботі [42] показано, що вміст нітрогену у формі нітрату, амонію та сечовини до  $1,7 \text{ г/дм}^3$ , не має інгібуючої дії при вирощуванні *Chlorella protothecoides*. При цьому приріст біомаси і швидкість росту більше за використання сечовини ( $18,4$ ;  $18,9$ ;  $19,6 \text{ г сухої маси/дм}^3$ , відповідно).

Споживання різних форм нітрогену призводить до зміни значення рН середовища. Так, використання нітрату калію може призвести до підлугування середовища до значення рН –  $8,5 \div 10$ . Інгібуюча дія нітрату калію на продуктивність культури спостерігалась при концентрації  $13 \text{ г/дм}^3$  [39]. Використання іонів амонію для хлорели може призвести до закиснення середовища до значення рН =  $3,5$ , при якому гинуть клітини. Тому, за використання різних форм нітрогену необхідно спостерігати за значенням рН середовища, особливо при їх одночасному використанні в різних співвідношеннях [45, 46].

Перевагою сечовини як джерела нітрогену є незначний вплив на значення рН, що не вимагає корекції середовища за цим показником. Утворення аміаку в процесі культивування за використання сечовини залежить від штаму мікровдоростей. Для спіруліни концентрація амонію в середовищі не повинна перевищувати 100 мг/дм<sup>3</sup> [39].

У роботі [47] було проведено дослідження з амонійним азотом у межах концентрацій 10 ÷ 1000 мг/дм<sup>3</sup>. Хоча активне наростання біомаси спостерігали за використання усіх концентрацій, незначне інгібування характерно як для дуже малих (10 мг/дм<sup>3</sup>), так і дуже високих (1000 мг/дм<sup>3</sup>). Було встановлено, що при більшій концентрації амонійного азоту у середовищі в клітинах зростає вміст протеїнів та хлорофілу. Вищий вміст амонійного азоту був спряжений з зростанням швидкості його споживання культурою. Так, при концентрації 750 мг/дм<sup>3</sup> швидкість споживання досягала 40 мг/дм<sup>3</sup> за добу. Тобто, при більш високих концентраціях амонійного азоту підвищується швидкість споживання, при цьому дуже високі концентрації іонів амонію уповільнюють швидкість зростання біомаси. Звідси випливає, що доцільно вносити азот у склад середовища порціями протягом всього періоду культивування.

Використання гідрокарбонату амонію також позитивно впливає на ріст хлорели, але частина нітрогену у виді аміаку при барботуванні виносить з реактору, що є небезпечним для людини. Споживання карбонату амонію як джерела нітрогену позитивно впливає на приріст ліпідів у *Scenedesmus rubescens* [48]. Але швидкість приросту біомаси та накопичення ліпідів нижче, ніж за використання сечовини [48].

У роботі [49], показано, що використання амонійного азоту призводить до збільшення вмісту ліпідної фракції у культурі *Chlorella vulgaris*. Вихід ліпідів за такого середовища досягав 9 мг/дм<sup>3</sup> за добу. Вміст насичених жирних кислот при використанні амонійного азоту на 70% перевищує їх вміст у випадку використання інших джерел азоту.

Вміст амонійного нітрогену у концентраціях  $0,4 \div 0,8$  г/дм<sup>3</sup> (NH<sub>4</sub>Cl, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) не має інгібуючої дії на хлорелу [39].

Для збільшення ліпідної продуктивності та зменшення вартості середовища (і, як наслідок, вартості біодизельного палива) пропонується використовувати збіднене на азот середовище [50].

Нестача азоту також має негативні наслідки для розвитку культури мікроводоростей. Нестача нітрогену призводить до зменшення вмісту хлорофілів і збільшення вмісту каротиноїдів та поліненасичених жирних кислот, що призводить до зниження приросту біомаси і якості біодизельного палива [48 – 57].

За використання методу математичного моделювання було встановлено оптимальний вміст нітратного джерела азоту (солей нітратної кислоти NaNO<sub>3</sub>, KNO<sub>3</sub>) для культивування *Chlorella vulgaris* за умов штучного освітлення яскравістю 4500 люкс з періодом 6 год. світло 18 год. темрява у плоскопаралельному фотобіореакторі з постійним пропусканням атмосферного повітря [48]. Максимальна швидкість нарощування біомаси 36,19 мг/дм<sup>3</sup> за добу характерна для середовища з щодобовою подачею NaNO<sub>3</sub> - 0,2 г/дм<sup>3</sup>, та 6 г/дм<sup>3</sup> CO<sub>2</sub>.

Таким чином, ріст мікроводоростей, накопичення клітинами ліпідів та їх якісний склад залежать від форми надходження нітрогену до клітини. Хлорела споживає нітроген у формі нітрату, амонію, сечовини та амінокислот. Одноразове введення іонів нітрату або амонію при промисловому вирощуванні може змінювати рН середовища, що негативно впливає на розвиток культури. Також не має однозначної відповіді щодо найбільш привабливого джерела нітрогену та його оптимальної кількості для вирощування мікроводоростей з метою одержання біодизельного палива. Не з'ясовано вплив одночасного вмісту різних форм нітрогену, що містяться у відходах, для вирощування мікровдоростей.

*Сульфур.* Сульфур входить до складу ферментів, амінокислот, пептидів, вітамінів, коферментів та інших сполук. Фізіологічна роль сульфур у хлорелі



пов'язана з процесами біосинтезу білків та ліпідів, поділу клітин. Сполуки сульфуру приймають участь в окисно-відновних реакціях та біохімічному перетворенні речовин. Більшість мікрободоростей засвоюють сульфур у формі сульфатів, які потім відновлюються до сульфідів [38]. Надходження сульфату до клітини відбувається шляхом активного транспорту, процес потребує освітлення і чутливий до температури [58].

Деякі види мікрободоростей здатні використовувати як джерело сульфуру сульфіти або тіосульфати, а також сульфур амінокислот метіоніну та цистеїну [59 – 62]. Додавання сульфіту до живильного середовища у концентраціях  $<1,0$  ммоль/дм<sup>3</sup> підвищує приріст біомаси *Chlorella vulgaris* на 30% відносно середовища з сульфатом при вирощуванні протягом 5 ÷ 10 год., коли сульфід не окиснений. При цьому збільшується швидкість фіксації CO<sub>2</sub> на одиницю білку. Більш високі концентрації інгібують ріст клітин [59].

Концентрації сульфуру в межах 20 ÷ 60 мг/дм<sup>3</sup> у живильному середовищі забезпечує нормальний ріст мікрободорості *Chlorella vulgaris* у неперервних умовах культивування. При нестачі сульфуру в живильному середовищі уповільнюється швидкість біосинтезу, руйнується механізм поділу клітин, що призводить до аномально великих розмірів клітин культури, знижується вміст хлорофілу та вихід метаболітів з клітин [39].

Нестача сульфуру в живильному середовищі також впливає на накопичення ліпідів. Так, культивування *Chlorella* sp. за умов нестачі сульфуру в середовищі призводить до тимчасового накопичення крохмалю в клітинах з наступним стрімким збільшенням кількості ліпідів в 1,5 ÷ 2,4 рази в порівнянні зі зразками, що вирощувалися за умов достатнього надходження сульфуру. При цьому відсоток загальної кількості насичених жирних кислот, акумульованих культурою, зростає від 24 до 59%, що є сприятливим для виробництва біодизельного палива [63]. Така поведінка пояснюється порушенням обміну метіоніну та цистеїну, і, відповідно, змінюється обмін інших амінокислот, що призводить до зміни біосинтезу білків, зменшуючи його ефективність. Цим пояснюється підвищення синтезу ліпідів та вуглеводів

за нестачі сульфуру в живильному середовищі. З іншого боку, з цистеїну через ряд метаболічних перетворень можуть утворюватися піруват, глутатіон та інші біологічно-активні сполуки, які відіграють важливу роль в обміні вуглеводів та ліпідів [64].

Нестача фосфору у хлорели негативно впливає, в першу чергу, на процеси асиміляції, в результаті чого уповільнюються темпи росту і накопичення сухої речовини. Не відбувається накопичення в клітинах запасних сполук, у тому числі й ліпідів. Натомість відбувається зміна їх жирнокислотного складу, що проявляється у підвищеному вмісті насичених жирних кислот [65].

Значення рН середовища впливає на розчинність мікроелементів. Підвищення значення рН призводить до випадання в осад гідроксидів металів і, відповідно, зниженню їх засвоєння, що негативно впливає на розвиток клітин. Зниження значення рН призводить до зміни рівноваги  $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$  і зменшенню засвоєння  $\text{CO}_2$  мікрободоростями. У той же час зміна рН призводить до зміни заряду поверхні клітин, що може призвести до їх загибелі. Для *Chlorella* оптимум рН лежить в межах 6,31 ÷ 6,84 [66].

Отже, склад середовища, форма живильних речовин та рН впливає на швидкість росту та розвитку мікрободоростей. Як видно з наведених вище джерел, змінюючи вміст необхідних для мікрободоростей елементів живлення можливо впливати на швидкість продукування ліпідної фракції. Необхідно з'ясувати форму та концентрацію нітрогену, за яких відбувається максимальне продукування ліпідів та насичених жирних кислот не зменшуючи при цьому приріст біомаси. Також необхідно визначити одночасний вплив ультразвукового опромінення та форми нітрогену на приріст біомаси та ліпідів у *Chlorella vulgaris*.

#### 1.4 Вплив параметрів освітлення на розвиток мікроводоростей

Світло є важливим елементом процесу фотосинтезу, без надходження якого не може підтримуватись на належному рівні життя жодного автотрофного організму. Мікроводорості ростуть за різної інтенсивності освітлення, виявляючи значні зміни загального хімічного складу клітин, вмісту пігментів та фотосинтетичної активності. Різна інтенсивність освітлення та довжина хвиль також впливає на ліпідний обмін в мікроводоростях, змінюючи якісний та кількісний склад ліпідів [67 – 77]. Висока інтенсивність світла призводить до окисних пошкоджень поліненасичених жирних кислот і змінює кількісний вміст C16:1 (3 *транс*) в мікроводоростях [67].

Мікроводорості *Chlorella vulgaris* використовують світло в діапазоні 400 ÷ 700 нм для фотосинтезу. Максимуми поглинання довжин хвиль варіюють у різних видів в залежності від концентрації та наявності пігментів. Для хлорофілу *a* потрібне світло з довжиною хвилі 450 ÷ 475 нм, для хлорофілу *b* - 630 ÷ 675 нм, а для каротиноїдів - 400 ÷ 550 нм.

Авторами роботи [68] було визначено оптимальні умови для культивування *Chlorella sp.* з використанням світлодіодів як джерела опромінення. У дослідженні використовували червоні (640 ÷ 700 нм.), сині (450 ÷ 480 нм.), білі (теплота 5000 К). За результатами досліджень було встановлено, що оптимальним є використання червоних, синіх і білих світлодіодів у співвідношенні 1/1/1, оскільки таким чином вони задовольняють потребу в освітленні всіх фотосистем. Також було встановлено, що необхідно проводити постійне перемішування середовища для рівномірного освітлення і запобігання утворення зон затемнення [68].

В аналогічному дослідженні [69] використовували сині (450 ÷ 480 нм), білі (теплота 5000 К), зелені (520 ÷ 555 нм), червоні (640 ÷ 700 нм) світлодіоди. Було встановлено, що найкраще мікроводоростями поглинається світло білих світлодіодів. При окремому використанні різних довжин хвиль - найменше

поглинається світло зеленого та червоного діапазонів. Також встановлено, що на 2-й день культивування при використанні зелених світлодіодів виникає пік приросту біомаси мікрободоростей. Це пояснюється тим, що зелений спектр освітлення сприяє синтезу карбон гідрату ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) в клітині, також зелений фотон має на 20% більше енергії ніж червоний і на 15,5% менше ніж синій [69]. Вважається, що його більша енергія призводить до уповільнення роботи фотосистем і, як наслідок, до однакових результатів з червоним спектром через обмежене поглинання каротиноїдами. Низькі результати використання червоних світлодіодів пояснюються обмеженим поглинанням хлорофілу *v* при неактивному хлорофілі *a*. Кращі результати синіх світлодіодів пояснюється активною роботою хлорофілу *a* та каротиноїдів, але відсутність активності хлорофілу *v* зменшує ефективність такого освітлення. Найкращі результати було одержано за освітлення білими світлодіодами, оскільки вони випромінюють спектр світла, який активує хлорофіли та каротиноїди, хоча і є менш інтенсивним та сильніше розсіюється. Одночасне збільшення у середовищі сполук фосфору та азоту призводить до необхідності використання освітлення більшої інтенсивності, оскільки при цьому підвищується швидкість метаболізму [69, 78 – 83].

Застосування комбінації світлодіодів може призвести до підвищення біосинтезу ліпідної фракції, що підтверджують дані роботи [84]. Освітлення інтенсивністю 1400 люкс мікрободорості *Scenedesmus sp. LXI* здійснювалося при наступних комбінаціях світлодіодів: білі, червоні, сині, червоні/сині у співвідношенні 3:1. На 17 день культивування вміст ліпідів становив, відповідно, %: 43,3; 39,5; 36,3 та 30,1, в той час як за природного освітлення вміст ліпідів складав 22,5%. Приріст біомаси був вищим за використання білих світлодіодів на 18%, ніж за використання лише червоних або синіх, а за використання комбінації червоних і синіх приріст майже не відрізнявся від контрольного дослід з сонячним світлом [84].

У роботі [85] наведено мінімальний необхідний спектр для росту та розвитку мікрободоростей. Для *Chlorella vulgaris* необхідним є світло з

довжиною хвилі  $460 \div 660$  нм з двома основними піками 460 нм і 660 нм, відповідно. Ці довжини хвиль відповідають світлу червоного та синього спектру. Але ефективність фотосинтезу за використання такого освітлення складатиме максимум 7%, що свідчить про необхідність визначення інших необхідних діапазонів спектру освітлення.

Було встановлено, що для повноцінного перебігу фотосинтезу в товщі листків рослин, так само як і в товщі культуральної рідини при високій концентрації мікроводоростей, можливе використання зеленого світла для збільшення ефективності фотосинтезу [85].

Використання світлодіодів червоного і синього спектру в теорії мало б задовольнити потреби мікроводоростей та бути оптимальним для накопичення ліпідів. У роботах [70 – 73] показано, що в залежності від умов культивування та складу середовища потреба в діапазонах опромінення може змінюватись. При використанні освітлення зеленим спектром фотосинтез іде інтенсивніше в товщі клітин, що супроводжується зростанням поглинання вуглекислого газу на  $10 \div 12\%$ .

Авторами роботи [86] було проведено дослідження впливу довжин хвиль зеленого світла на хлоропласти клітин вищих зелених рослин, але результати можуть бути застосовані і для клітин *Chlorella vulgaris* через подібність будови хлоропластів. Використання комбінованого червоного та синього освітлення як контролю має повністю задовольняти потреби хлоропластів у світловій енергії. Були використані світлодіоди: сині 470 нм, червоні 639 нм, зелені 522 нм. При використанні окремо синіх, червоних та зелених світлодіодів усі показники: швидкість приросту, споживання вуглекислого газу, вміст ферментів фотосинтезу вказували на стабільну залежність, у якій опромінення синіми світлодіодами було найефективнішим, опромінення червоними світлодіодами має менший ефект ніж синіми, а опромінення зеленими призводить до зниження усіх показників майже на 50% порівняно з синіми. Було встановлено, що інтенсивність синього світла впливає на експресію мультипротеїнового комплексу фотосистеми II. Зі

збільшенням інтенсивності світла зростає і експресія комплексу, що свідчить про більшу інтенсивність фотосинтезу. При використанні комбінації синіх і червоних та окремих синіх світлодіодів значного розвитку досягали верхні шари хлоренхіми листків, більш глибокі шари не досягали нормального розвитку, як і при використанні природного світла. За використання комбінації зелених, синіх і червоних світлодіодів більш глибокі шари були більш розвинені порівняно з комбінацією червоних та синіх [86]. Вплив зеленого світла на інтенсивність фотосинтезу також підтверджено у дослідженнях [87–94].

Періодичність освітлення має велике значення для усіх автотрофних організмів, оскільки у світловий період відбувається накопичення енергії, яка потім використовується у темновій фазі для роботи циклу Кальвіна, в якому синтезуються вуглеводи.

У роботі [95] проаналізовано вплив різної інтенсивності (2500 та 5000 люкс) та періодів освітлення (8:16, 16:8, 0:24, 24:0 - світло:темрява, відповідно) на мікроводорості *Chlorella vulgaris*. Найбільший приріст біомаси (0,63 г/дм<sup>3</sup>) спостерігали при періодичності освітлення 16 годин світло, 8 годин темрява. В той час як найбільше продукування ліпідів (13,9%) характерно для умов освітлення з періодичністю 8 годин світло, 16 годин темрява. Але загальний вихід ліпідів був більшим при збільшенні терміну освітлення за рахунок підвищення приросту біомаси. Використання постійного освітлення або його відсутності призводить до пригнічення життєдіяльності культури. Було встановлено, що використання ламп з інтенсивністю освітлення 5000 люкс сприяло більшому виходу біомаси, ніж їх інтенсивність у 2500 люкс.

Склад ліпідів також залежить від періоду освітлення. Так, у роботі [96] показано, що клітини мікроводорості *Chlorella vulgaris* продукують більше насичених жирних кислот (33,38%) за періодичного освітлення 16 год. світло, 8 год. темрява. При зменшенні терміну освітлення (8 год. світло, 16 год. темрява) накопичуються мононенасичені (15,93%) та поліненасичені (27,40%)

жирні кислоти. При збільшенні тривалості освітлення підвищується приріст біомаси і, відповідно, загальний вихід ліпідів вищий, ніж у випадку зниження терміну освітлення (8:16). Тобто, підвищений синтез ліпідів за зниження терміну освітлення нівелюється зниженням приросту біомаси.

Також приріст біомаси та ліпідів одночасно залежить як від режиму освітлення, так і концентрації CO<sub>2</sub>. Було встановлено [97], що при концентрації 5% CO<sub>2</sub> у барботажній суміші найбільший приріст біомаси *Chlorella protothecoides* характерний для режиму освітлення 16 год. світло, 8 год. темрява. При збільшенні подачі CO<sub>2</sub> до 10% швидкість росту збільшується при режимі освітлення 12 год. світло, 12 год. темрява. Тобто, при збільшенні концентрації CO<sub>2</sub> необхідно збільшувати темнову фазу росту.

У роботі [98] проаналізовано дію режимів освітлення починаючи з 24:0 (світло:темрява) з кроком 0,5 год. Встановлено, що поділ клітин стає інтенсивнішим через 4 год. після початку неперервного освітлення. При цьому концентрація хлорофілу в клітині зменшується зі збільшенням інтенсивності освітлення протягом певного часу. Тобто термін роботи хлорофілу залежить як від інтенсивності освітлення, так і від періоду опромінення. При опроміненні періодичним світлом клітини втрачають значну частину хлорофілу в період поділу, фотосинтетична активність зменшується на 75%. Показано, що клітини відновлюють необхідний вміст хлорофілу у темновій фазі за 1 годину. При неперервному культивуванні клітини здатні адаптуватися до постійного освітлення і не потребують темної фази для відновлення вмісту хлорофілу. В той же час за умов безперервного освітлення можливе зростання загибелі клітин внаслідок дії високої інтенсивності світла.

Як видно з досліджень, які наведені вище, вихід біомаси мікродоростей та якісний і кількісний склад ліпідної фракції залежать від параметрів освітлення, раціональні значення яких можуть змінюватися для різних штамів та умов культивування. Тому визначення впливу довжини хвилі та їх комбінації, а також режиму освітлення на приріст біомаси та

продукування ліпідів мікроводоростями *Chlorella vulgaris* є завданням дослідження.

### 1.5 Вплив температури на процес культивування мікроводоростей

Температура має велике значення при культивуванні мікроводоростей. Як і будь-яким рослинним організмам мікроводоростям характерне певне оптимальне значення температури, за якого всі процеси в клітині відбуваються з максимальною інтенсивністю. Зміна температури від оптимальної призводить до пригнічення життєдіяльності та загибелі мікроводоростей. Клітини *Chlorella vulgaris* відносяться до мезофільних мікроорганізмів [8].

У роботі [99] було встановлено, що оптимальна температура для культивування *Chlorella vulgaris* складає 27,5 °С. Культивування проводилося на стандартному середовищі M8 та середовищі з підвищеним вмістом азоту у вигляді сечовини. Освітлення здійснювалося флюорисцентними лампами 30 Вт Sylvania (Китай) та 32 Вт Philips (Китай). Барботування здійснювали сумішшю повітря і вуглекислого газу з вмістом CO<sub>2</sub> у суміші 2%. Період освітлення складав 16 годин світло, 8 годин темрява. Дослідження температур проводили в межах 15 ÷ 38 °С з кроком 0,5 °С. Приріст біомаси за оптимальної температури складав 0,29 од/год.

Авторами роботи [100] було встановлено, що накопичення ліпідів та синтез жирних кислот відбувається інтенсивніше за температури 25 °С за використання розчину цукру 10 г/дм<sup>3</sup> та необхідних амінокислот 1 г/дм<sup>3</sup> як джерела живлення. Мікроводорості *Chlorella vulgaris* культивувалися у діапазоні температур 20 ÷ 35 °С. Максимальний вміст насичених жирних кислот досягався при температурі 25 °С і складав 82% від всіх жирних кислот. Так, при культивуванні за такої температури максимальна концентрація біомаси склала 4,83 г/дм<sup>3</sup>, максимальна продуктивність синтезу ліпідів 164 мг/дм<sup>3</sup> за добу. При відхиленні від температури 25 °С зростає вміст ненасичених жирних кислот і зменшується швидкість приросту біомаси.



Тобто, біосинтез біомаси, ліпідів та їх склад одночасно залежить від джерела живлення та температури. Не встановлено зв'язок оптимальної температури накопичення біомаси та ліпідів мікродоростей зі складом живильного середовища. Так, за використання сечовини як джерела нітрогену значення температури, що призводить до найбільшого приросту біомаси мікродоростей *Chlorella vulgaris*, складає 27,5 °С. За використання гетеротрофного живлення (амінокислоти як джерело нітрогену) максимальний вихід насичених жирних кислот характерний для температури 25 °С. Таким чином, необхідно з'ясувати раціональну температуру, за якої буде відбуватись найвищий приріст біомаси та накопичення ліпідів з перевагою насичених жирних кислот.

#### Висновки до розділу

1. Вплив ультразвукового опромінення різної частоти на мікроорганізми, в основному, досліджували на клітинах дріжджів. Показано, що на інтенсифікацію метаболізму клітин впливає частота опромінення, потужність, тривалість та періодичність. Стимулюючий вплив на розвиток мікроорганізмів оказує низькочастотне опромінення в діапазоні частот 20 – 100 кГц. В той же час короткотривале опромінення високою частотою (2,2 МГц) низької потужності легше переноситься мікроорганізмами, ніж частотою до 100 кГц при підвищеній потужності. Збільшення терміну обробки та потужності призводить до руйнування та загибелі клітин. Дослідження впливу ультразвукового опромінення на мікродорості не проводилось.

Ультразвукове опромінення може впливати на зміну метаболізму мікроорганізмів в бік утворення певних продуктів, або для їх знешкодження. Тому визначення впливу параметрів (довжини хвилі, терміну обробки, потужності) опромінення на зміну метаболізму мікродоростей в бік утворення ліпідів (триацилгліцеролів) є задачею даної роботи.

2. Продукування ліпідів мікродоростями, як і їх розвиток,

залежить від форми та концентрації живильних елементів, особливо сульфору та нітрогену. При нестачі нітрогену та сульфору підвищується вихід ліпідів. Споживання мікрободоростями різних форм нітрогену впливає на значення рН середовища і, відповідно, на розвиток та метаболізм клітин. За використання амонію як джерела нітрогену підвищується біосинтез триацилгліцеролів, за використання нітрату та сечовини відбувається біосинтез поліненасичених жирних кислот.

Необхідно з'ясувати як одночасна дія ультразвукового опромінення різної частоти та різних сполук нітрогену буде впливати на зміну метаболізму мікрободоростей *Chlorella vulgaris* в бік продукування триацилгліцеролів – сировини для одержання біодизельного палива.

3. Кожний вид мікрободоростей має властивий йому набір пігментів, що визначає довжини хвиль, які необхідно використовувати при освітленні. Застосування тільки червоних світлодіодів робить неактивним хлорофіл *a*, що знижує інтенсивність фотосинтезу і, відповідно, приріст біомаси. При опроміненні синіми світлодіодами спектр частот уловлюється хлорофілом *a* та каротиноїдами, але при цьому не активний хлорофіл *b*, що також знижує швидкість приросту біомаси. Освітлення білими світлодіодами, які випромінюють широкий спектр частот, призводить до активації як хлорофілів, так і каротиноїдів, але має більшу ступінь розсіювання. Не визначено раціональної комбінації довжин хвиль на продукування триацилгліцеролів *Chlorella vulgaris*.

Тому визначення впливу якісного складу спектру та інтенсивності його складових на вихід біомаси та ліпідів *Chlorella vulgaris* є завданням роботи.

## РОЗДІЛ 2

### ВИБІР НАПРЯМКІВ ТА МЕТОДИК ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1 Вибір напрямків досліджень

Одним з актуальних питань сьогодення є пошук альтернативних екологічно чистих джерел енергії. Таким джерелом є біодизельне паливо. Але його одержання з олійних рослин потребує земель сільськогосподарського призначення і, відповідно, не зможе задовольнити потреби суспільства у енергоносії. Альтернативою рослинам є мікроводорості, вирощування яких не потребує родючої землі, і за використання фотореакторів не є сезонним.

Існуючи на сьогодні генномодифіковані штами мікроводоростей, у яких вміст ліпідів перевищує 70%, не доступні в Україні. Тому одним з напрямків роботи є одержання підвищеного вмісту ліпідів у клітинах розповсюдженого виду – *Chlorella vulgaris*.

Клітини мікроводоростей змінюють метаболізм під впливом стресових факторів. Підвищений вміст ліпідів характерних для клітин, що вирощують в умовах недостатньої кількості нітрогену та сульфуру, але за таких умов знижується приріст біомаси і такі методики не є ефективними для промислового виробництва. Одним з факторів, що впливає на метаболізм клітин, є їх опромінення різними довжинами хвиль. Отже, напрямом дослідження є визначення раціональної довжини хвилі звукового або ультразвукового спектру, його інтенсивності на зміну метаболізму мікроводоростей в бік підвищеного біосинтезу триацилгліцеролів без зменшення швидкості приросту біомаси.

Розвиток клітин мікроводоростей залежить від надходження світлової енергії. Кожний вид має власний набір фоточутливих пігментів, які визначають спектр поглинання світла. В залежності від інтенсивності та співвідношення довжин хвиль видимого спектру будуть синтезуватись в

більшій кількості характерні для даних світлових умов речовини, що позначається на розвитку клітин в цілому. Природне освітлення має весь набір довжин хвиль видимого спектру. Але в умовах України, інтенсивність природнього освітлення в зимовий, осінній та весняний періоди не достатня для інтенсивного продукування біомаси мікроводоростей. Також в період темряви в енергетичних потребах клітин можуть використовуватись органічні речовини, що може призвести до втрати до 25% біомаси. Тому напрямком дослідження також є визначення раціонального співвідношення довжин хвиль видимого спектру за використання світлодіодів як джерела енергії.

Відомо, що джерело нітрогену впливає як на приріст біомаси, так і на якісний вміст ліпідів у клітинах *Chlorella vulgaris* [101 – 103]. Оскільки відходи як джерело живлення можуть містити різні форми нітрогену, тому визначення впливу нітрат-, амоній- іонів та сечовини на приріст біомаси та біосинтез ліпідів є наступним напрямком дослідження.

Результатом дослідження є обґрунтування раціональних параметрів вирощування біомаси *Chlorella vulgaris* з підвищеним вмістом триацилгліцеролів.

## 2.2 Культивування мікроводоростей

Метою досліджень було встановлення раціональних параметрів культивування мікроводоростей за використання ультразвукового опромінення як стресового фактора з максимальним продукуванням триацилгліцеролів – вихідної сировини для одержання біодизельного палива. Також досліджували вплив співвідношення довжин хвиль видимого спектру та вплив джерела нітрогену на приріст біомаси та продукування ліпідів.

### 2.2.1 Мікрроводорості виду *Chlorella vulgaris*

Хлорела (*Chlorella*) відноситься до відділу зелених водоростей (*Chlorophyta*), порядку хлорелові (*Chlorellales*), родини хлорелові (*Chlorellaceae*). Рід хлорела включає в себе ряд видів одноклітинних водоростей з хроматофорами зеленого кольору і діаметром клітин від 1,5 до 10 мікрон. Зовні клітини вкриті твердою двоконтурною оболонкою целюлозної природи. Оболонка багатьох видів містить шар спорополеніну, що надає їй хімічної стійкості та міцності. У деяких видів хлорели у стінці є лише мікрофібрилярний шар, а тришаровий зовнішній компонент з спорополеніну відсутній. Запасні речовини крохмаль та безбарвна олія [8 – 10, 79, 104].

*Chlorella vulgaris* – представник родини зелених водоростей (*Chlorophyceae*). Даний вид зустрічається досить часто, особливо у прісних водоймах. Зазвичай представлений поодинокими клітинами, не зібраними у асоціації.

Вміст різних біологічних макромолекул у сухій масі може змінюватись у наступних межах: білки 51 ÷ 58%, вуглеводи 12 ÷ 17%, ліпіди 14 – 43%. Основні жирні кислоти представлені C16, C18 і C20 сполуками. У 1 г сухої речовини хлорели знаходяться (в мкг): каротин - 600; вітамін А - 100; В<sub>1</sub> - 18; В<sub>2</sub> - 28; В<sub>6</sub> - 9; В<sub>12</sub> - 0,1; С - 1300; провітамін D - 1000; К - 6; РР - 180; Е - до 350; пантотенова кислота - 17; фолієва кислота - до 485; біотин - 0,1; лейковорин - 22 [33].

Також організми роду *Chlorella* містять необхідні макро- та мікроелементи для нормального розвитку і функціонування організму людини і тварин: ферум, купрум, манган, цинк, молібден, бор, кобальт, сіліцій та інші.

Крім того хлорела синтезує природний антибіотик «хлорелін», який успішно знищує патогенну мікрофлору в концентрації 1: 500000 і 1: 1000000, він ефективний проти стрептококів, стафілококів, кишкової палички і, меншою мірою, проти збудника туберкульозу [3].

Як посівний матеріал використовували культуру мікроводоростей *Chlorella vulgaris* АСКУ 531-06, яка надана Київським національним університетом ім. Тараса Шевченка (рис. 2.1).

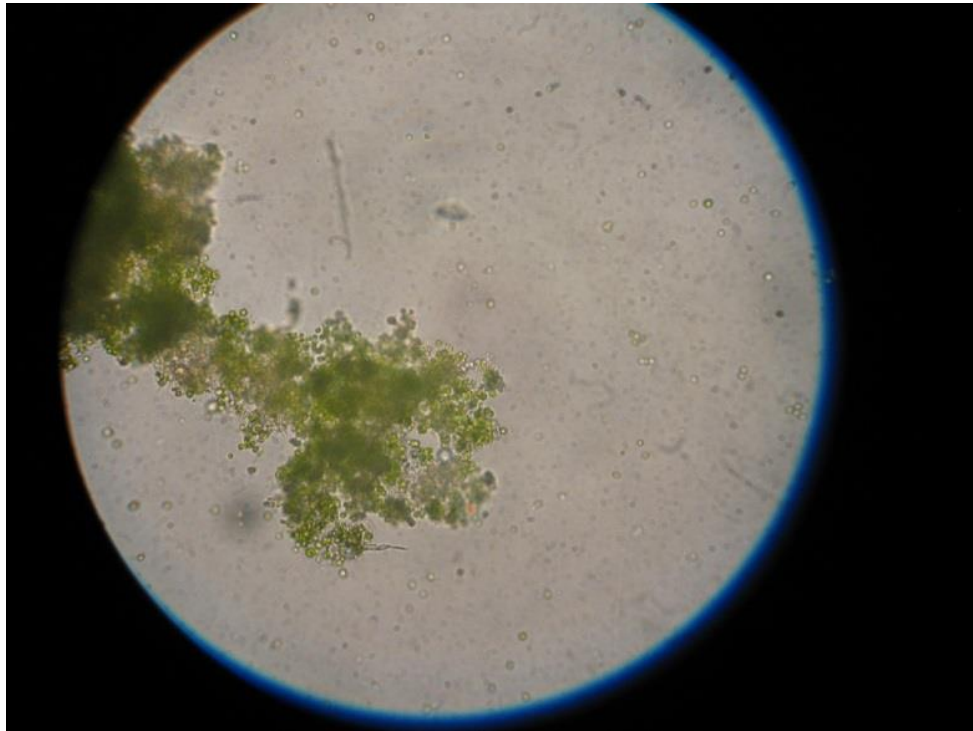


Рис. 2.1. Культура мікроводоростей *Chlorella vulgaris*, збільшення x 40

### 2.2.2 Склад поживного середовища

Головними факторами, які впливають на якість поживного середовища, є його компонентний склад та рН. В роботі як базове середовище застосовували середовище Б. В. Громова № 6, яке відноситься до селективних середовищ [3, 8]. Склад середовища (г/дм<sup>3</sup>): KNO<sub>3</sub> - 1,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 0,2; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0,2; CaCl<sub>2</sub> - 0,15; NaHCO<sub>3</sub> - 0,2; мікроелементи - 1 см<sup>3</sup>/дм<sup>3</sup>. Розчин мікроелементів (г/дм<sup>3</sup>): ЕДТА - 10,0; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0,22; MnSO<sub>4</sub> - 1,81; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O - 0,079; NaBO<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O - 2,63; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O - 1,0; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 9,3; CaCl<sub>2</sub> - 1,2; Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O - 0,02.

Для запобігання утворення осаду компоненти вносили у наведеній послідовності. Спочатку вносили трилон Б (ЕДТА), який утворює комплекси з іонами металів і запобігає утворенню нерозчинних солей [1, 6, 10].

*Модифіковане за нітрогеном середовище.* У базовому середовищі нітрат калію замінювали на еквівалентну за кількістю нітрогену кількість амоній нітрату, або амоній хлориду, або сечовини.

Середовища автоклавували протягом 1 год. при температурі 120 °С і тиску 250 кПа. рН середовища не повинно перевищувати значення 7 для запобігання випадання в осад фосфатів важких металів та випаровування аміаку.

Екстракт з посліду свійських птахів готували: наважку посліду заливали 1 дм<sup>3</sup> води, настоювали 24 год. при перемішуванні за допомогою магнітної мішалки ММ-5 (Росія). Розчин, що утворився, відфільтровували, і кип'ятили протягом 1 год. Екстракт, що одержали, автоклавували протягом 1,5 год. при температурі 120 ÷ 135 °С і тиску 250 кПа. Аліквоту розчину вводили у фотореактор.

### 2.2.3 Устаткування для культивування мікрободоростей

#### 2.2.3.1 Лабораторна установка для нарощування біомаси

Фотобіореактор (рис. 2.2), який застосовується в дослідженні, відноситься до циліндричних колонних реакторів з аероліфтом 7. Фотобіореактор (об'ємом 1,4 дм<sup>3</sup>) складається з капролонового днища 9, в яке за допомогою гумових манжетів вставлено прозору трубу з поліакрилу 8 з діаметром 0,06 м, яка зверху закривається кришкою 5. В днищі 9 передбачено зливний клапан 10, який застосовується для відбору проб та зливання середовища з фотобіореактора. Для реалізації аероліфту в кришці 5 за допомогою гумових манжетів закріплено тягову трубу з поліакрилу 7 діаметром 0,03 м. У середині цієї труби через один з отворів 4 на кришці проведено шланг з фторопласту 6 діаметром 0,006 м, по якому подається суміш повітря та вуглекислого газу для барботування.

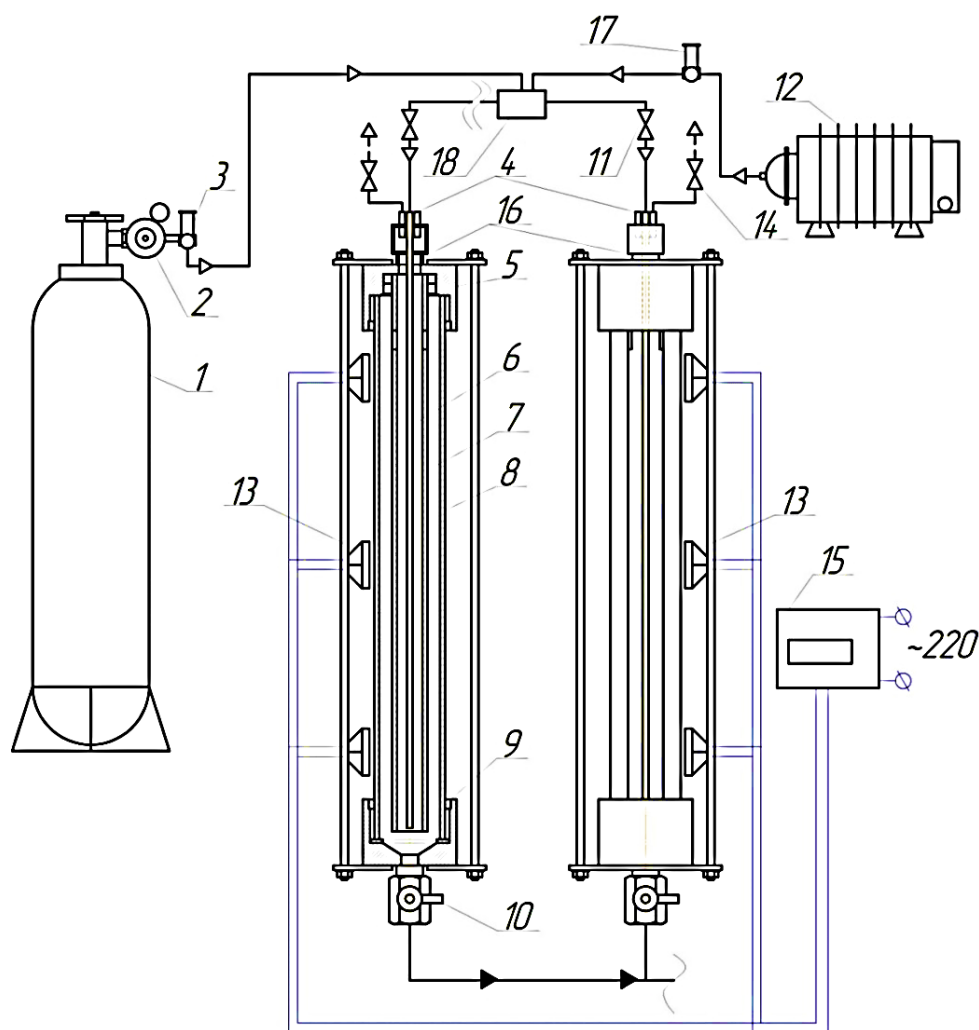


Рис. 2.2. Схема лабораторної установки для культивування мікроводоростей:

1 – балон з вуглекислим газом; 2 – редуктор; 3 – ротаметр для регулювання подачі  $\text{CO}_2$ ; 4 – окремі входи та виходи для подачі середовища, барботажного повітря, інокуляту і видалення відпрацьованого повітря; 5 – кришка; 6 – трубка для подачі барботажного повітря; 7 – тягова труба; 8 – корпус; 9 – днище; 10 – клапан для відбору проб та зливу культури; 11 – клапан для регулювання подачі барботажного повітря; 12 – повітряний насос; 13 – система світильників; 14 – клапан для відводу відпрацьованого повітря; 15 – реле часу, 16 – ковпачки для підтримання положення ерліфтної труби, 17 – ротаметр для регулювання подачі повітря, 18 – система змішування повітря і  $\text{CO}_2$ .



Регуляція подачі суміші газів здійснюється за допомогою клапану 11, вихід відпрацьованого газу з фотобіореактора реалізовано за допомогою клапанів 14. Подача атмосферного повітря здійснюється за допомогою повітряного компресора 12, об'єм повітря, що подається, регулюється ротаметром 3 [105, 106].

Подача вуглекислого газу здійснюється з балону 1 під тиском, контроль тиску в балоні здійснюється за допомогою редуктора 2. Кількість вуглекислого газу, що подається, регулюється за допомогою ротаметра 3 (У-30/АР40П (Росія) і Visi-Float VFA,  $0 \div 1$  дм<sup>3</sup>/хв. (США). Швидкість потоку CO<sub>2</sub> варіювали в межах  $0,005 \div 0,03$  м<sup>3</sup>/год. в залежності від концентрації мікробіодоростей. Барботування проводили протягом 1 хв. щодоби.

Система освітлення реалізована за допомогою комбінації світильників 13, контроль часу освітлення проводили за допомогою реле часу 15.

Лабораторний фотобіореактор завантажується вручну один раз на період культивування. Для цього до фотореактора вносили поживне середовище та інокулянт (10% об'єму). Початковий вміст суспензії *Chlorella vulgaris* складав приблизно  $8160000 \pm 217600$  клітин у см<sup>3</sup>, що відповідає оптичній густині суспензії  $D_{450} = 0,375 \pm 0,01$ . Після завантаження кожен з ємностей закручували спеціальною кришкою зі зворотним клапаном, який необхідний для забезпечення належного рівня асептики.

Установка для культивування мікробіодорості *Chlorella vulgaris* містить систему фотореакторів, які поєднані системою подачі барботажного повітря та CO<sub>2</sub>. Нагнітання атмосферного повітря забезпечує компресор АСО-006 (Китай) продуктивністю 85 дм<sup>3</sup>/хв..

Розподіл газової суміші по фотобіореакторам здійснювали за допомогою спеціальної гребінки, обладнаної клапанами та вентилями для регулювання витрат газової суміші у кожному з циліндрів. Подачу барботажного повітря контролювали за допомогою клапанів, що під'єднанні до гребінки для змішування CO<sub>2</sub> та повітря. Для раціонального забезпечення культури поживними речовинами та надходженням світлової енергії швидкість

надходження барботажного повітря підтримували на рівні  $600 \text{ см}^3/\text{хв.}$  в кожній секції. У гребінці також передбачено механізм змішування повітря і вуглекислого газу, що подається з балону.

Дана конструкція системи фотореакторів дозволяє забезпечити однакові умови культивування у кожному з реакторів, що необхідно для визначення параметрів біотехнологічного процесу.

Визначення рН та вмісту іонів амонію проводили за допомогою рН-метра рН-150МИ (виробник - РФ) за методикою, що наведена в інструкції [107].

### 2.2.3.2 Система освітлення

Для визначення впливу довжин хвиль освітлення на приріст біомаси та ліпідів було обрано світлодіоди, довжини хвиль яких відповідають максимумам поглинання пігментів мікроводоростей фотосистеми I та II в процесі фотосинтезу [69 – 77]. Було використано наступні комбінації світлодіодів: білі; жовті; червоні та сині; червоні, сині та зелені тощо. Довжини хвиль, що відповідають кольору спектру, мають наступні діапазони: сині світлодіоди -  $450 \div 480 \text{ нм}$ , червоні -  $640 \div 700 \text{ нм}$ , зелені -  $520 \div 555 \text{ нм}$ . Білі та жовті світлодіоди містять спектр з різними довжинами хвиль, тому вказується лише теплота світла. Для білих світлодіодів вона складала  $5500 \text{ К}$ , для жовтих –  $3500 \text{ К}$ .

Для послідовного підключення світлодіодів було розраховано напругу, яка складала  $21 \text{ В}$ . Напруга на білих світлодіодах -  $3 \div 4 \text{ В}$ , жовтих -  $3 \div 4 \text{ В}$ , червоних -  $3,2 \div 3,4 \text{ В}$ , синіх -  $1,8 \div 2,0 \text{ В}$ , зелених -  $3,1 \div 3,5 \text{ В}$ . Для створення заданої напруги обрано стандартне джерело живлення на  $24 \text{ В}$ . Схему підключення світлодіодів наведено на рис. 2.3.

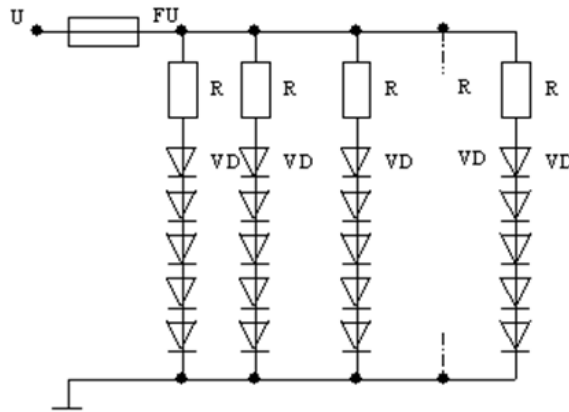


Рис. 2.3. Схема підключення світлодіодів:

$U$  – місце підведення напруги 24 В, FU – запобіжник, R – опір, який розраховано окремо для кожної гілки, VD – лінія світлодіодів, в одній гільці сила струму 20 мА.

Потужність опромінення 10 світлодіодами складала: білі - 7,5 Вт, що відповідає інтенсивності освітлення 983 люкс; червоні/сині - 6,2 Вт, 334 люкс; сині/жовті/червоні/помаранчеві - 5,6 Вт, 435 люкс; 9 світлодіодів сині/червоні/зелені - 6,9 Вт, 476 люкс. Як контроль використовували природне освітлення протягом 15 год., яке коливалось у широких межах інтенсивності - 1000 ÷ 9000 люкс.

Виміри освітлення проводили за допомогою цифрового люксметра LX101 (виробник - Китай), спектр визначення довжин хвиль світла в якому знаходиться в межах 400 ÷ 700 нм. Для визначення потужності випромінювання світлодіодів використовували вимірювач потужності світла DT-1307 (виробник - Китай).

На рис. 2.4 наведено фотореактор з підключеним джерелом світла.

#### 2.2.4 Обладнання для опромінення хвилями різної частоти

Для визначення дії ультразвукового опромінення на метаболізм клітин мікроводорості *Chlorella vulgaris* як джерело прямокутних імпульсів було зібрано генератор Меандра з цифровою індикацією частоти власного

виготовлення за схемою GN800k. Як випромінювач було використано високочастотний пьезовипромінювач АК059 (виробник - РФ) (рис. 2.5).

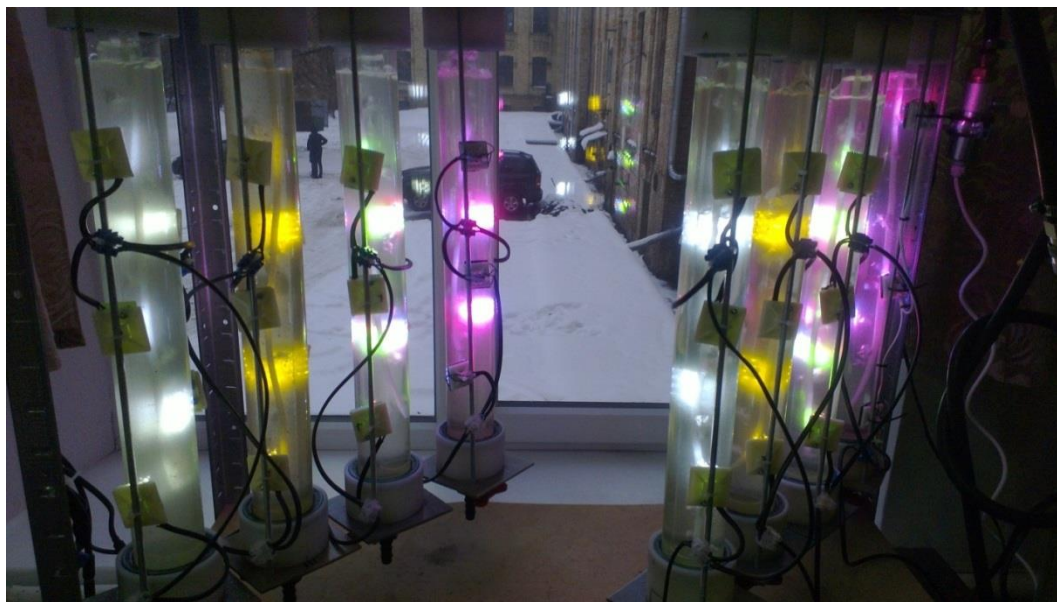


Рис. 2.4. Фотореактор з системою освітлення



Рис. 2.5. Ліворуч, генератор GN800k, праворуч, пьезовипромінювач АК059

Генератор відкалібровано і налаштовано на випромінювання імпульсів у діапазоні спектра частот від 5 до 25 кГц. Потужність, що споживається випромінювачем, складає 4 Вт. Сила звуку на відстані між реактором і випромінювачем складає 5 Вт/см<sup>2</sup>. Опромінювання здійснювали з різною періодичністю.

### 2.2.5 Установка для дослідження впливу довжини хвилі світла

Для дослідження впливу світлового опромінення різної довжини хвилі на розвиток мікродоростей було створено ізольований від природного світла пристрій, в якому можливо змінювати комбінацію та кількість світлодіодів, які використовували для освітлення (рис. 2.6.). Кожна комірка також ізольована від інших, які освітлюються іншими довжинами хвиль.

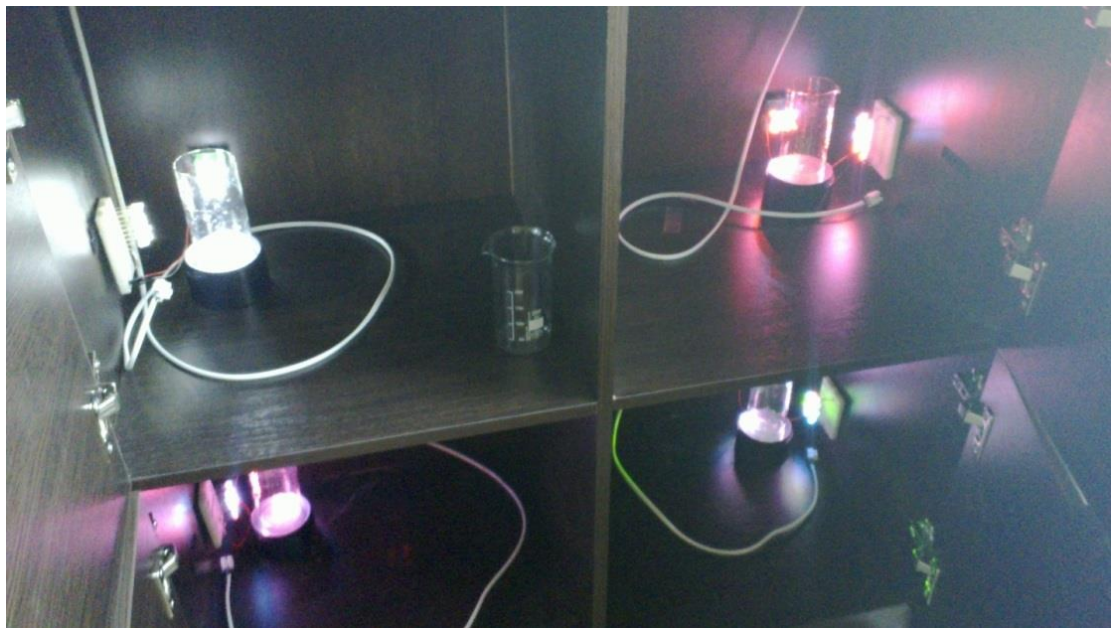


Рис. 2.6. Система для вирощування мікродоростей без доступу природнього світла

У даній установці ємностями для культивування слугували прозорі скляні стакани об'ємом  $200 \text{ см}^3$ , які обертались зі швидкістю 5 об/хв. за допомогою обертального стенду Таїюа (виробник - Японія). Така система забезпечує рівномірне освітлення культури протягом культивування. Освітлення здійснювали за допомогою світлодіодів, встановлених комплектами по 10 або 20 одиниць. Співвідношення світлодіодів обирали враховуючи фізіологічні особливості *Chlorella vulgaris*. Періодичність освітлення регулювали за допомогою реле часу власного виготовлення. Для забезпечення клітин джерелом карбону щодоби здійснювалося барботування  $\text{CO}_2$  зі швидкістю  $0,1 \text{ дм}^3/\text{хв}$ .

### 2.2.6 Визначення приросту біомаси та розмірів клітин

Спостереження за розвитком культури *Chlorella vulgaris* здійснювали методом світлової мікроскопії за допомогою мікроскопа ТМ ХSP-139TP (Ulab, Китай). Розміри клітин визначали за допомогою мікрометра Ulab 1DIV=0.01mm (виробник - Китай).

Підрахунок кількості клітин мікродоростей в об'ємі рідини здійснювали за допомогою камери Горяєва за стандартною методикою [108]. Число клітин у 0,001 дм<sup>3</sup> досліджуваної суспензії визначали за формулою:

$$X = a \cdot 50000 \cdot b, \quad (2.1)$$

де  $a$  - середня кількість підрахованих клітин у п'яти квадратах,  $b$  - розведення вихідної суспензії, 50000 - коефіцієнт перерахунку об'єму п'яти великих квадратів на 0,001 дм<sup>3</sup>.

Зміну приросту біомаси визначали за значенням оптичної густини суспензії, яку вимірювали за допомогою спектрофотометра Ulab 102 (виробник - Китай) при довжині хвилі 450 нм, оскільки максимальний спектр поглинання світла хлорофілом  $a$  знаходиться в межах 430 ÷ 450 нм [94 – 98, 109]. Для дослідження використовували скляні кювети з довжиною оптичного шляху  $l = 1$  см. За калібрувальним графіком знаходили кількість клітин та приріст біомаси. Експериментальну залежність оптичної густини від кількості клітин в 1 см<sup>3</sup> наведено в табл. 2.1.

Таблиця 2.1

#### Залежність оптичної густини від кількості клітин *Chlorella vulgaris*

в 1 см<sup>3</sup>

Оптична густина	0,4	0,455	0,47	0,5	0,52	0,54	0,56	0,58	0,60
Кількість клітин, x10 <sup>7</sup>	0,94	1,21	1,3	1,45	1,61	1,86	1,84	2,0	2,12

Коефіцієнт перерахунку оптичної густини у кількість клітин мікродорості визначено за використання математичного опису лінії тренда:

$$N = D_{450} 3 \cdot 10^7, \quad (2.2)$$

де  $N$  - кількість клітин у  $1 \text{ см}^3$  суспензії;  $D_{450}$  - оптична густина суспензії при довжині хвилі 450 нм.

Питому швидкість приросту клітин мікродоростей  $\mu$  за добу розраховували за формулою [38]:

$$\mu = (\ln N_t - \ln N_0)/t, \text{ доба}^{-1}, \quad (2.3)$$

де  $N_t$  - кількість клітин мікродоростей в одиниці об'єму в момент часу  $t$ ;  $N_0$  - кількість клітин мікродоростей в одиниці об'єму на початку культивування;  $t$  - тривалість культивування, діб.

Час генерації  $g$ , який необхідно для одного циклу поділу клітини дорівнює:

$$g = t/n = t \ln 2 / [\ln N(t) - \ln N_0(t_0)], \quad (2.4)$$

де  $n$  - кількість поділів клітин мікродоростей в одиниці об'єму в момент часу  $t$ ;  $N_t$  - кількість клітин мікродоростей в одиниці об'єму в момент часу  $t$ ;  $N_0$  - кількість клітин мікродоростей в одиниці об'єму на початку культивування;  $t$  - тривалість культивування, діб.

Для визначення сухої маси мікродоростей використовували ваги ВЛА-200г-М (виробник - Україна). Для відділення біомаси мікродоростей з культурального середовища використовували прибор вакуумного фільтрування ПВФ-35/2 Б (виробник - РФ) та вакуумний насос 2XZ-0.5 ULAB (виробник - Китай). Фільтрування проводили за використання фільтрувального паперу (синя стрічка ТУ 6-09-1678-95, Україна)

Висушування біомаси проводили у сушильній шафі 2В-151 (виробник - РФ) при 110 °С до досягнення постійної ваги. Концентрацію біомаси визначали за формулою:

$$C_B = \frac{(m_k - m_n) \cdot 1000}{V}, \text{ г/дм}^3, \quad (2.5)$$

де  $m_k$  - маса фільтру з біомасою після висушування;  $m_n$  - маса фільтру, 1000 - перерахунок на об'єм 1 дм<sup>3</sup>,  $V$  - аліквота, з якої одержували суху біомасу, дм<sup>3</sup>.

#### 2.2.7 Методика визначення складу жирних кислот та кількості ліпідів у біомасі мікроводоростей

Визначення вмісту ліпідів у біомасі мікроводоростей проводили за методом Сокслета [52]. До наважки сухої біомаси мікроводоростей додавали пісок у співвідношенні 1:2,5, відповідно, та перемішували. Одержану масу кількісно переносили в паперову гільзу. Довжина гільзи повинна бути нижчою за верхнє коліно h-подібної сифонної трубки. Як екстрагент використовували гексан, який наливали у попередньо зважену приймальну колбу. Екстракцію проводили протягом часу, за який відбувається повне знебарвлення розчину (6 год. при 6 – 10 зливах за годину). Після завершення екстрагування гексан з приймальної колби відганяли для повторного використання. Ліпіди, що залишилися в приймальній колбі, висушували в сушильній шафі 2В-151 (виробник - РФ) до постійної маси при 105 °С. Вміст ліпідної фракції у біомасі мікроводоростей визначали за формулою:

$$x = \frac{a-b}{g} \times 100, \quad (2.6)$$



де  $x$  - вміст ліпідної фракції, %,  $a$  - маса колби з ліпідною фракцією, г,  $b$  - маса порожньої колби, г,  $g$  - маса наважки мікродоростей, г.

Склад ліпідів установлювали методом газорідинної хроматографії за допомогою хроматографа HP-1100 («Хьюлетт Паккард», США) за стандартною методикою [110]. Визначення проводили за використання естерів жирних кислот, для чого попередньо здійснювали реакцію омилення ліпідів. Для цього до ліпідної фракції додавали суміш КОН в метанолі, інтенсивно струшували і витримували у сушильній шафі при 80 °С. Після охолодження естери жирних кислот екстрагували гептаном. Аналіз проводили за допомогою хроматографа у якому міститься мас-спектрометр. Зразки метилових естерів жирних кислот ( $1 \cdot 10^{-6}$  дм<sup>3</sup>) вводили до колонки SP-2560 (100мм x 0,25 мм x 0,2 мкм). Газ носій - гелій, швидкість потоку - 1,2 см<sup>3</sup>/хв. Температура інжектора і детектора 250 і 260 °С, відповідно. Ідентифікацію жирних кислот проводили порівнюючи період виходу естеру кислоти з аналогічними показниками стандартів.

#### 2.2.8 Визначення вмісту хлорофілів $a$ та $b$

Екстракцію хлорофілу з клітин мікродоростей здійснювали за методикою Річі [111]. З огляду на гідрофобні властивості пігментів для екстракції використовували 96% етанол. Наважку масою 0,5 г гомогенізували у ступці перемішуючи з 10 см<sup>3</sup> 96% етанолу. Одержану суміш центрифугували на центрифугі 80-2А (виробник – Китай) при 10000 об/хв. протягом 15 хв. З одержаного супернатанту відбирали 0,5 см<sup>3</sup> і змішували з 4,5 см<sup>3</sup> 96% етанолу. Густина одержаного розчину визначали за допомогою спектрофотометра Ulab 102 при довжинах хвиль 664 нм та 649 нм. Вміст хлорофілу  $a$  та  $b$  розраховували за формулами:

$$Ch-a=13,36A_{664} - 5,19 A_{649}, \quad (2.7)$$

$$\text{Ch-b} = 27,43A_{649} - 8,12 A_{664}, \quad (2.8)$$

де, Ch-a - вміст хлорофілу *a* (мг/см<sup>3</sup>); Ch-b - вміст хлорофілу *b* (мг/см<sup>3</sup>);  $A_{649}$  - поглинання світла при 649 нм;  $A_{664}$  - поглинання світла при 664 нм.

### 2.2.9 Математична обробка одержаних даних і оцінка похибок

Всі експерименти були проведені в трьох повторах. Для опрацювання результатів досліджень використовували стандартні методи обробки експериментальних даних. За результатами вимірювань для оцінки величин, що містять випадкові похибки використовували метод найменших квадратів. Графічну інтерполяцію проводили за допомогою MSExcel.

Отримані дані були використані для розрахунку наступних показників:

1)

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}, \quad (2.9)$$

де,  $n$  - число спостережень,  $\bar{x}$  - середнє арифметичне величини.

2)

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}, \quad (2.10)$$

де,  $\sigma$  - середнє квадратичне відхилення (стандартне відхилення) окремого визначення у вибірці

3)

$$m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}, \quad (2.11)$$

де,  $m$  - стандартна помилка середнього відхилення

Діапазон значень  $m$ , показує діапазон в якому повинно знаходитися середнє значення будь-якої випадкової величини. Кінцеві результати подавали у вигляді  $|\bar{X} \pm m|$ . Результати експерименту вважалися достовірними за умови, що стандартна помилка середнього відхилення не перевищувала 5% [112].

#### Висновки до розділу

Устаткування, що використані у роботі, дозволяють: проводити культивування мікродоростей зі зміною діапазону хвиль освітлення, його інтенсивності та створювати стресову дію за рахунок опромінення мікродоростей різними звуковими частотами для зміни метаболізму клітин.

Методики, що використовуються у роботі дозволяють: проводити аналіз культуральної рідини, визначати приріст біомаси, вміст ліпідної фракції, кількісний та якісний склад ліпідів, спостерігати за розвитком клітин тощо.

За результатами роботи, що надано в цьому розділі, опубліковано патент на корисну модель [106].

### РОЗДІЛ 3

## ВПЛИВ ОПРОМІНЕННЯ РІЗНОЇ ЧАСТОТИ НА РІСТ ТА РОЗВИТОК МІКРОВОДОРОСТЕЙ *CHLORELLA VULGARIS*

Авторами робіт [5,6,10, 113] показано, що метаболізм клітин залежить від умов культивування мікроводоростей, які можуть призвести до підвищеного біосинтезу визначених речовин. Підвищений синтез ліпідів відбувається за стресових умов: або дії фізичних факторів, або зміни форми чи нестачі живильних речовин. Одним з фізичних факторів, які змінюють метаболізм клітин, є дія опромінення різними частотами. Опромінення може призвести як до виникнення мутацій і, відповідно, до зміни метаболітів, що продукуються клітиною, так і до пригнічення біосинтезу складних речовин, що призводить до перерозподілу потоків енергії та речовини в бік утворення сполук багатих на енергію – ліпідів та вуглеводів. Також дія опромінення сприяє утворенню вільних радикалів. Це призводить до підвищеного синтезу пероксидази, каталази і супероксиддисмутази, що забезпечує захист клітини від кисневих радикалів. Опромінення сприяє біосинтезу ненасичених ліпідів, які завдяки механізму пероксидації слугують захисними сполуками від дії радикалів кисню, внаслідок чого збільшується в клітинах вміст малондиальдегіду - продукту окиснення поліненасичених жирних кислот [114]. Також опромінення може викликати руйнування мембран та клітини в цілому. Тому вивчення дії опромінення різної частоти на клітини мікроводоростей є актуальною задачею.

Метою дослідження цього розділу є встановлення параметрів опромінення – частоти та тривалості на розвиток культури *Chlorella vulgaris* та біосинтезу нею ліпідної фракції.

На клітину впливає частота, потужність та тривалість опромінення. Найбільшу ефективність на біохімічні процеси та життєдіяльність має частота опромінення, оскільки частота коливань може:

- діяти як ударна хвиля, що призводить до пошкодження мембрани та внутрішньоклітинних органел;
- вступати в резонанс з частотами клітини, що може призвести до інтенсифікації процесів метаболізму;
- змінювати напрям перебігу процесів, що призводить до утворення сполук, відмінних від тих, що синтезуються при традиційному вирощуванні;
- призводити до мутацій, що змінює властивості клітин;
- утворювати радикали, що призводить до пошкодження мембран та метаболізму клітини, і, відповідно, впливає на обмін речовин;
- змінювати форму поживних речовин, що впливає на ступінь їх засвоєння тощо.

Виходячи з вищенаведеного, задачею дослідження було визначення частоти опромінення, дія якої сприяє розвитку культури та накопиченню нею ліпідної фракції.

### 3.1 Вплив опромінення частотами звукового діапазону

Опромінення частотами діапазону  $5 \div 20$  кГц здійснювали протягом 2 хвилин при потужності  $5 \text{ Вт/см}^2$ . Культивування біомаси мікроводоростей проводили при температурі  $18 \pm 2$  °С.

Динаміку приросту біомаси *Chlorella vulgaris* (за зміною густини суспензії) під дією опромінення звуковими хвилями різної частоти (5, 10 та 15 кГц) та початку ультразвукового спектру (20 кГц) наведено на рис.3.1. Фаза сповільненого росту для усіх зразків триває протягом 6 діб, що можна пояснити зміною температурного режиму культивування. Найбільш тривалою (8 діб) є фаза експонентного росту при дії частот 20 кГц та 15 кГц. За використання більш низьких частот - 10 кГц та 5 кГц темпи приросту культури сповільнюються, але тривалість експонентної фази підвищується до 12 діб. При чому більшу оптичну густину має суспензія, яку опромінювали частотою 10 кГц. Підвищення оптичної густини культури, яку не опромінювали

(контроль), має лінійну залежність протягом 17 діб. При цьому значення густини після 20 доби культивування збільшується по відношенню до культур, що опромінювалися низькими частотами.

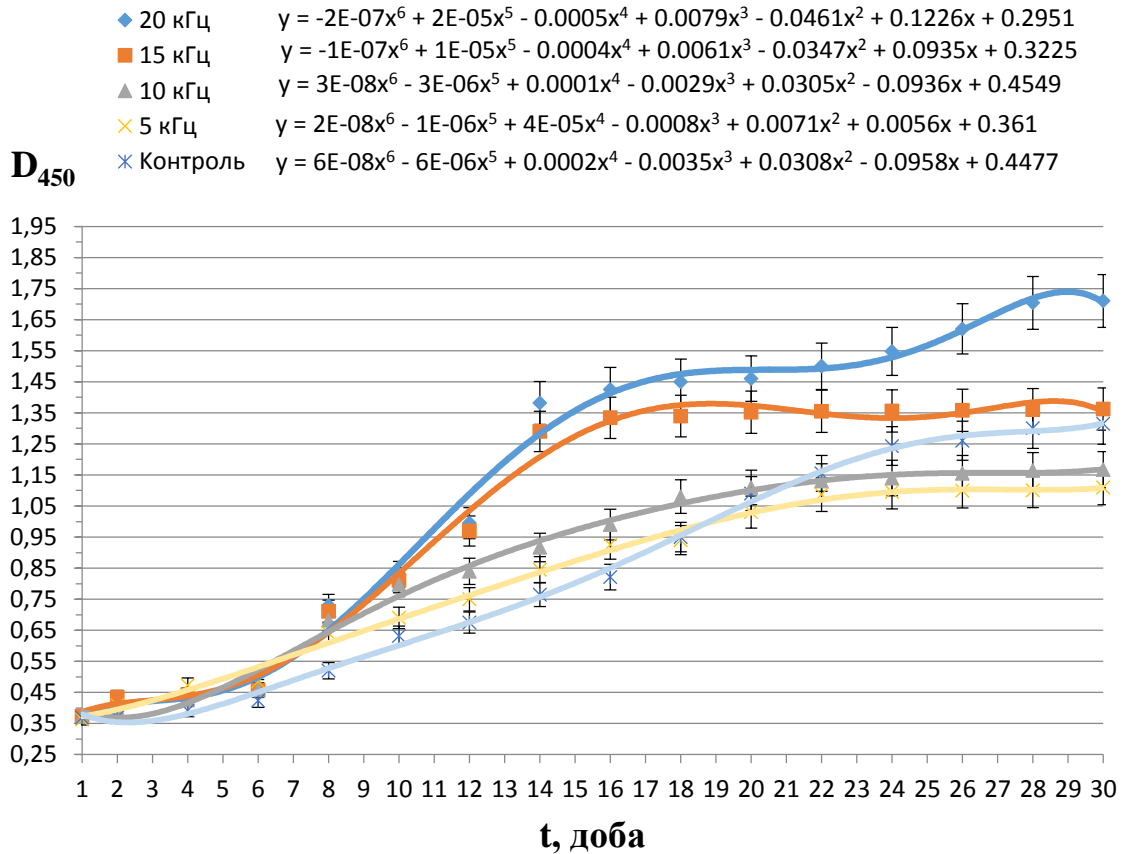


Рис. 3.1. Зміна оптичної густини ( $D_{450}$ ) суспензії культури *Chlorella vulgaris* в процесі вирощування (t) під дією опромінення звуковими коливаннями різної частоти: 5, 10, 15, та ультразвуковою 20 кГц,  $P \leq 0,05$ .

Аналогічна форма кривих характерна для динаміки питомого приросту кількості клітин в процесі вирощування. На рис.3.2 наведено приріст клітин *Chlorella vulgaris* в залежності від частоти опромінення культури. Дія опромінення всіма довжинами хвиль призводить до збільшення відносного приросту клітин починаючи з 4 доби і триває для високих частот (15 та 20 кГц) 4 доби, для низьких (5 та 10 кГц) - 6 діб. Відносний приріст клітин у контролі переважає приріст клітин при низькочастотному опроміненні після 11 доби.

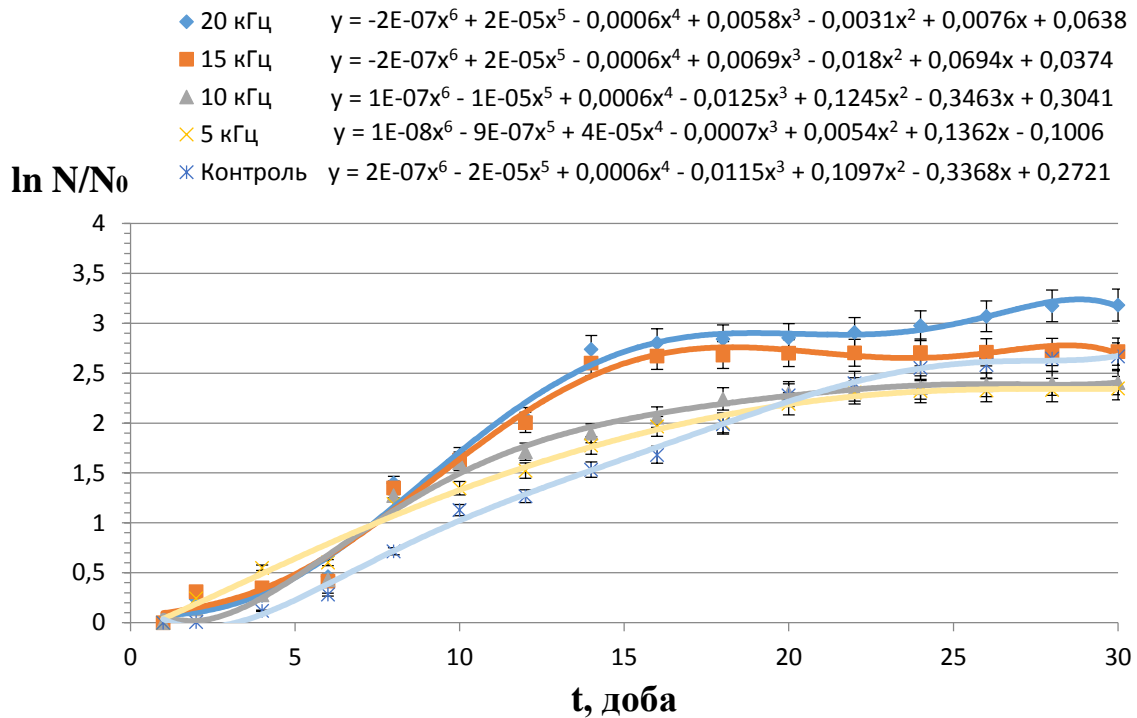


Рис. 3.2. Відносний приріст клітин *Chlorella vulgaris* ( $\ln N/N_0$ ) при культивуванні ( $t$ ) під дією звукових коливань частотою 5, 10, 15, та ультразвуковою 20 кГц,  $P \leq 0,05$ .

Дія звукового опромінення різної частоти впливає на форму клітин та формування колоній. При культивуванні під дією звукових хвиль розміри клітин у середньому збільшуються з підвищенням частоти опромінення і досягають  $5 \div 10$  мкм порівняно з контролем ( $2 \div 6$  мкм). Найбільший розмір клітин  $8 \div 11$  мкм характерний для обробки ультразвуком частотою 20 кГц. Також за відсутності обробки опроміненням клітини утворюють колонії великих розмірів і на  $7 \div 8$  добу культивування окремих клітин майже не спостерігається. При обробці звуковими хвилями колонії мають нерівномірні краї і розміри у  $3 \div 4$  рази менше, ніж колонії без обробки, при цьому підвищується вміст поодиноких клітин (рис. 3.3).

На рис.3.4 наведено приріст біомаси *Chlorella vulgaris* та ліпідів за 30 діб культивування під дією опромінення різними частотами. Як видно з рис. 3.4 частота опромінення впливає як на приріст біомаси, так і вихід ліпідної фракції. По відношенню до контрольного зразка приріст біомаси вищий при

опроміненні культури частотами 20 та 5 кГц. Для 20 кГц приріст біомаси більший на 10% по відношенню до контролю.

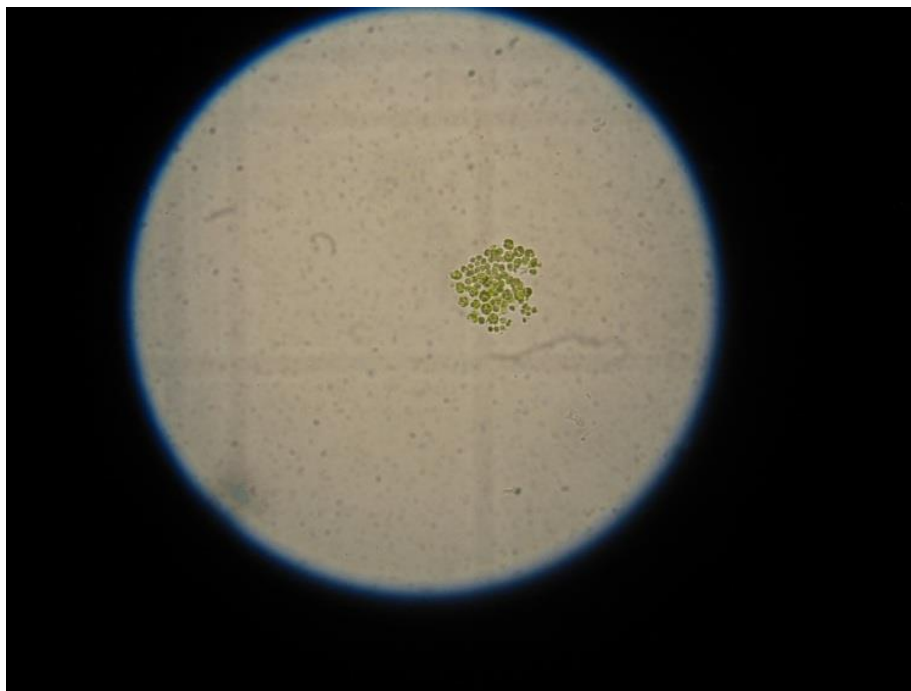


Рис. 3.3. Колонії *Chlorella vulgaris*, що утворюються при дії опромінення частотою 20 кГц

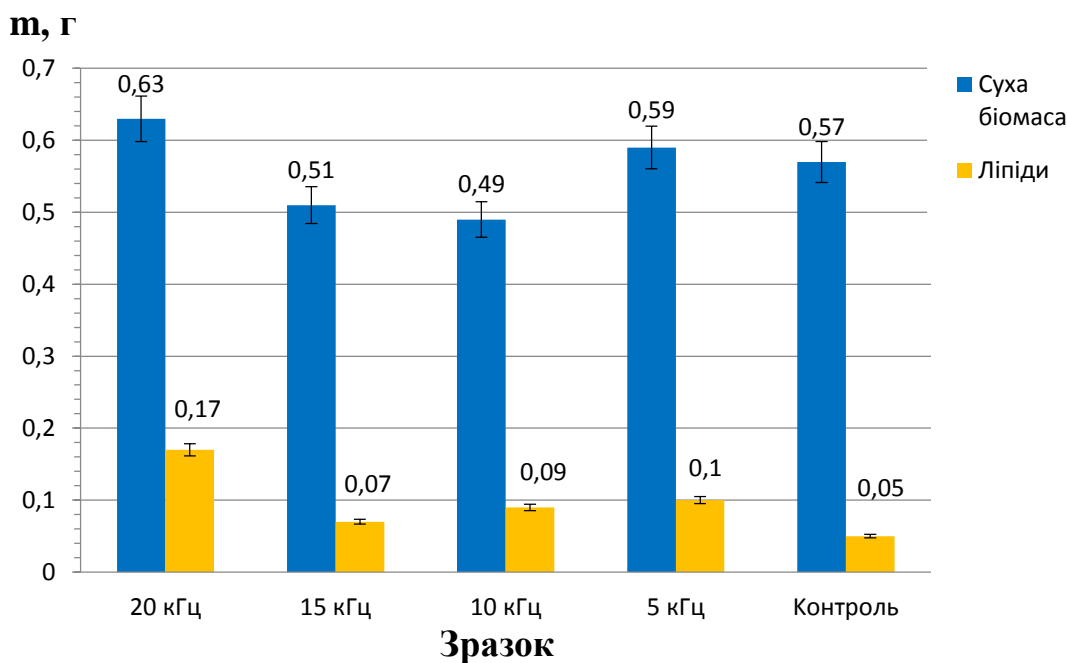


Рис. 3.4. Приріст біомаси та ліпідів (m) мікробіодоростей *Chlorella vulgaris* при дії звукових коливань частотою 5, 10, 15, 20 кГц та культури, яку не опромінювали (контроль), на 30 добу культивування,  $P \leq 0,05$ .



При опроміненні частотою 10 і 15 кГц приріст біомаси менший, ніж у контрольному досліді, що не відповідає даним рис. 3.1 та 3.2. Таку невідповідність приросту біомаси можна пояснити утворенням колоній та розмірами клітин, що залежать від дії опромінення різної частоти. Це впливає на показники як питомої густини, так і кількості клітин при підрахунку у камері Горяєва.

Тобто, під дією опромінення частотами 15 та 10 кГц підвищується біосинтез пігментів фотосинтетичної системи, але не відбувається пропорційний приріст біомаси. Таку дію звукового опромінення даними частотами можна пояснити їх руйнівним впливом на мембрани клітин. Можливо при постійній дії таких частот внаслідок хвильового тиску руйнуються слабкі зв'язки за рахунок збільшення амплітуди коливань атомів у ліпопротеїдах, що призводить до часткової загибелі клітин, про що свідчить відсутність приросту питомої густини після 14 та 18 доби для наведених частот, відповідно (рис. 3.1).

Культивування мікроводорості *Chlorella vulgaris* під дією опромінення різними частотами призводить до зміни метаболізму клітин і підвищеного біосинтезу ліпідної фракції по відношенню до контрольного зразка (рис. 3.4). Так, вміст ліпідів збільшується у 3 рази по відношенню до контрольного зразка для культури, що вирощувалась під дією ультразвукового опромінення (20 кГц). Під дією опромінення у 5 кГц вміст ліпідів збільшується вдвічі. Найменший біосинтез ліпідів як і біомаси спостерігається під дією опромінення у 15 кГц.

На рис. 3.5. наведено діаграму зміни питомого вмісту ліпідів у сухій біомасі мікроводоростей в залежності від дії різної частоти опромінення при культивуванні. Дія опромінення усіма частотами, що використовували, призводить до збільшення питомого вмісту ліпідів у біомасі мікроводоростей. Найвищий питомий вміст характерний для культури, яку опромінювали частотою 20 кГц і досягає 27%, що у 3 рази більше ніж у випадку контролю. Дія опромінення частотою 10 кГц, хоча і призводить до зниження швидкості

росту на 11% по відношенню до контролю, але підвищує питомий вміст ліпідної фракції вдічі. Опромінення частотою 5 кГц підвищує вихід ліпідів у 1,9 разів, і хоча питомий вміст ліпідів нижче, ніж у випадку опромінення частотою 10 кГц, підвищення приросту біомаси при опроміненні даною частотою дає змогу отримати вищий вихід ліпідів в цілому при тривалому культивуванні. Тобто опромінення частотою 5 кГц можна використовувати для зміни метаболізму клітин і підвищеного біосинтезу ліпідної фракції. Найнижчий питомий вміст ліпідів у культурі, яку вирощували під дією опромінення частотою 15 кГц. Хоча вміст ліпідів і більше на 56% по відношенню до контролю, але зниження приросту біомаси на 10% призводить до підвищення виходу ліпідів всього на 18%, ніж при культивуванні без дії опромінення, і дає підставу вважати застосування такої частоти нерентабельним для культивування мікроводорості з метою отримання біодизельного палива.

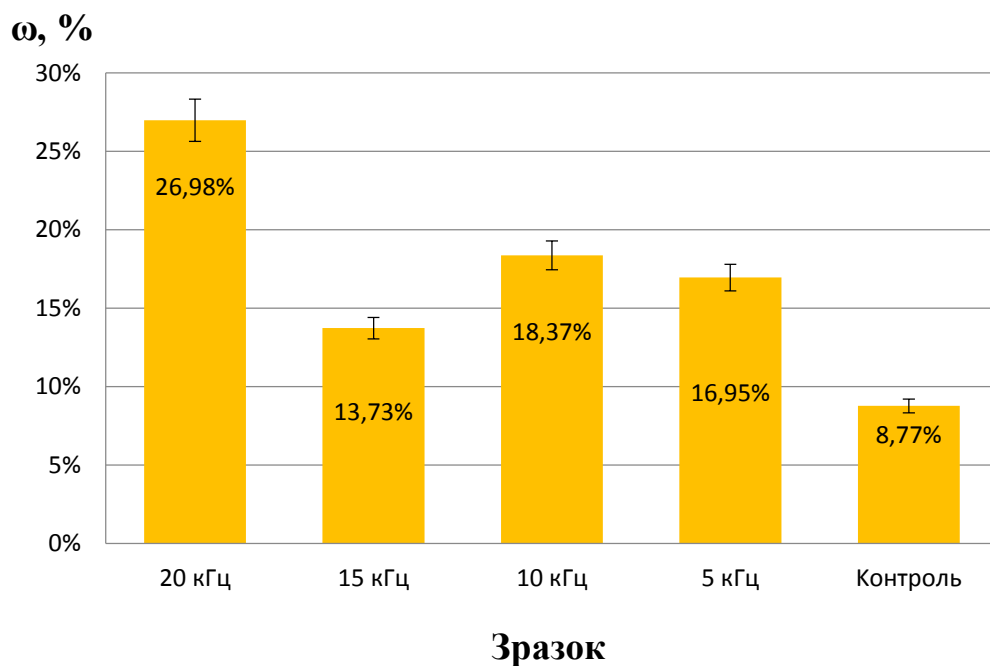


Рис. 3.5. Питомий вміст ліпідної фракції ( $\omega$ ) у біомасі *Chlorella vulgaris* в залежності від дії звукових коливань частотою 5, 10, 15, 20 кГц та без опромінення (контроль),  $P \leq 0,05$ .

Оскільки усі умови культивування були однакові окрім дії опромінення звуковими хвилями різної частоти, то виходячи з наведених даних, можна

стверджувати, що опромінення частотами 5, 10, 15 та 20 кГц неоднозначно впливає як на інтенсивність, так і напрямок метаболізму мікроводоростей. Опромінення будь-якої частоти є стресовим фактором для клітин *Chlorella vulgaris*, у відповідь на який відбувається підвищений біосинтез запасних енергетичних речовин триацилгліцеролів – вихідної сировини для отримання біодизельного палива.

Найбільш інтенсивно на розвиток клітин впливає дія ультразвукового опромінення (20 кГц). Під дією такої частоти збільшується біосинтез хлорофілу, і, відповідно, інтенсивність фотосинтезу, про що свідчить кут нахилу експонентної кривої зміни оптичної густини з часом (рис. 3.1). Під дією ультразвуку відбувається інтенсифікація масообміну через мембрани за рахунок їх деполяризації та мікроциркуляції органічних та неорганічних сполук, що підвищує активний транспорт живильних речовин через мембрану [115]. Це призводить до збільшення швидкості накопичення біомаси, про що свідчить збільшення розміру клітин.

Також опромінення ультразвуковою частотою впливає на ступінь осадження клітин на поверхні фотореактора. Під дією ультразвуку відбувається руйнування колоній, відділення клітин від стінок реактора і, як наслідок, зменшення зон затемнення і покращення освітлення культури, що також призводить до підвищення біосинтезу і приросту біомаси.

Дія звукового опромінення частотою 5 кГц також має стимулюючий вплив - підвищується швидкість активного транспорту внаслідок зростання активності  $H^+$ -АТФази мембран, що призводить до підвищеного приросту ліпідної фракції і збільшення біомаси в цілому по відношенню до контрольного зразка [116].

Дія частот 15 та 10 кГц ймовірно підвищує тиск у клітинах, що призводить до руйнівних деформаційних змін мембран і негативно впливає на їх розвиток і, відповідно, призводить до зниження приросту біомаси.

Таким чином, для підвищення приросту біомаси в процесі культивування мікроводоростей *Chlorella vulgaris* можливо використовувати

опромінення культури звуковими частотами у 5 та 20 кГц. Рациональною частотою для одержання клітин, які збагачені ліпідами, є опромінення 20 кГц. За таких умов біосинтез ліпідів підвищується у 3 рази, що дає підґрунтя для створення технології отримання біодизельного палива з мікроводоростей *Chlorella vulgaris* [117].

### 3.2 Вплив опромінення ультразвукового спектру на розвиток клітин *Chlorella vulgaris* та біосинтез ліпідів

Дія опромінення частотами ультразвукового спектру на клітини мікроводоростей може призвести як до їх загибелі, так і до прискореного метаболізму клітин, і, відповідно, дасть змогу знизити собівартість процесу культивування, підвищити продуктивність фотореактора і рентабельність біотехнології одержання біодизельного палива з мікроводоростей.

Для визначення впливу ультразвукового опромінення на життєдіяльність клітин мікроводорості *Chlorella vulgaris* досліджували дію опромінення частотою: 20; 22,5; 25 кГц. Такий діапазон частот було обрано виходячи з того, що дія високих частот призводить до руйнації клітин і, відповідно, не є перспективною для технологічного процесу.

Опромінення мікроводоростей ультразвуковими частотами 20 ÷ 25 кГц здійснювали протягом 1 хвилини при потужності 5 Вт/см<sup>2</sup>. Культивування біомаси мікроводоростей проводили при температурі 28 ± 2 °С.

На рис. 3.6 наведено динаміку питомого приросту клітин мікроводоростей під дією ультразвукових коливань частотою 20 ÷ 25 кГц. Як видно з рис. 3.6, при дії ультразвуку частотою 20 кГц при температурі 28 ± 2 °С лаг-фаза триває 2 доби. При цьому тривалість фази експонентного росту довша, ніж при відсутності опромінення. Дія опромінення такої частоти сприяє виникненню мікропотоків середовища навколо мембрани, що призводить до збільшення інтенсивності обміну речовин і, відповідно, до прискореного розвитку клітин мікроводоростей. Завдяки рідинно-

кристалічній структурі мембран опромінення призводить до виникнення коливань у мембранах. Збільшення рухливості ліпідів біліпідного шару позитивно впливає на швидкість полегшеної дифузії і іонного транспорту.

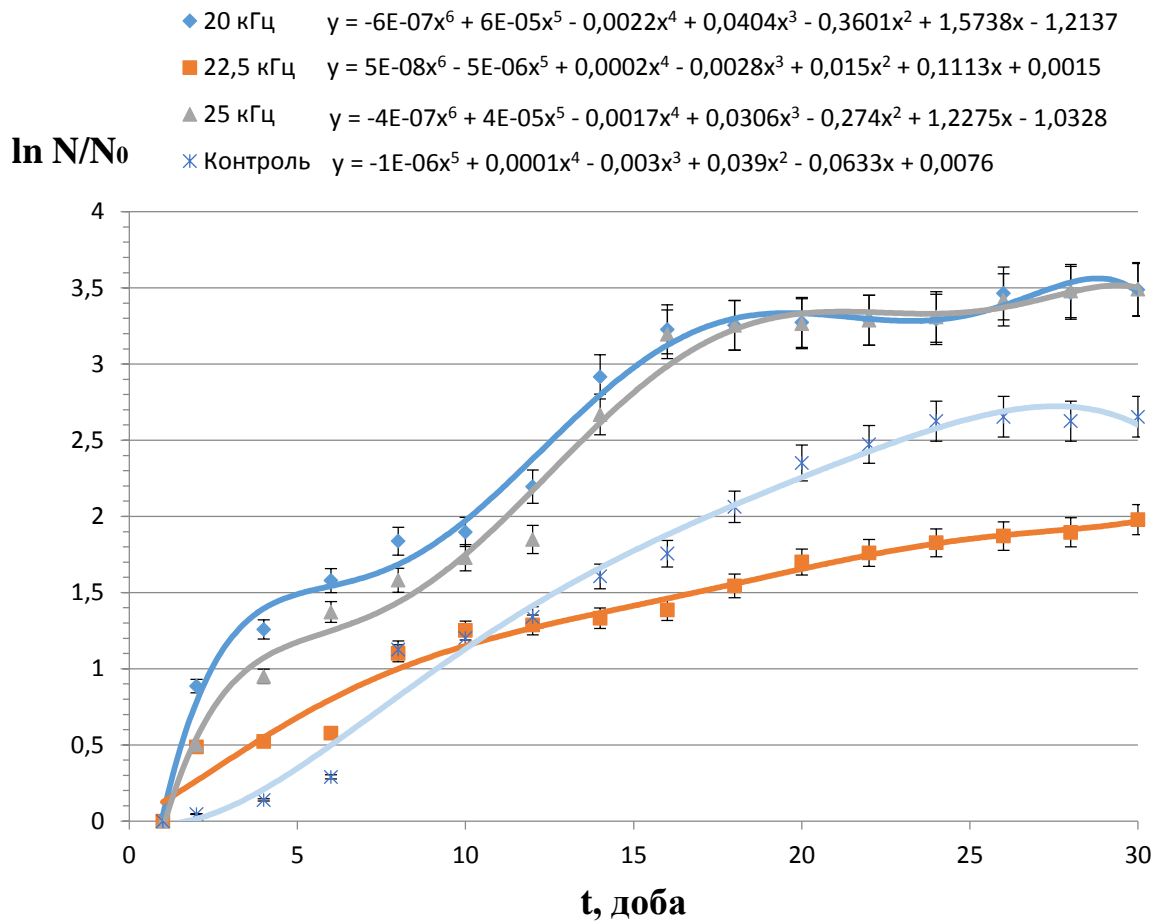


Рис. 3.6 Відносний приріст клітин *Chlorella vulgaris* ( $\ln N/N_0$ ) при культивуванні ( $t$ ) під дією ультразвукових коливань частотою 20, 22,5, 25 кГц,  $P \leq 0,05$ .

Внаслідок постійного руху молекул мембрани розмір окремої ділянки поверхні клітини постійно змінюється, що створює потоки середовища до клітини і від неї. Це призводить до більш швидкого руху іонів навколо клітинного простора. Рух молекул в шарі мембрани в цілому також призводить до переміщення іонних каналів і транспортних білків, що в свою чергу прискорює частоту взаємодії їх з відповідними іонами і молекулами. Більша швидкість обміну речовин призводить до більш швидкого росту клітин. Також підвищенню швидкості обміну речовин сприяє збільшення площі мембран при

збільшенні розмірів клітин *Chlorella vulgaris* під дією опромінення ( $5 \div 10$  мкм, при опроміненні частотою 20 кГц,  $2 \div 6$  мкм без опромінення).

Зміна швидкості перенесення речовин через мембрану також призводить до деполяризації мембран. Потенціал спокою для *Chlorella vulgaris* складає  $120 \div 150$  мВ, при короткочасній дії ультразвукового опромінення заряд мембрани змінюється до 0,68 мВ [17]. Зміна потенціалу, в свою чергу, сприяє прискоренню транспорту через мембрани аніонів, що містять азот, фосфор та інші життєво необхідні іони. Оскільки захисним механізмом клітин на дію ультразвукового опромінення є прискорення синтезу РНК та розчинних білків у клітині, то зростає потреба в азоті [118]. Збільшення надходження нітрогену до клітин викликає збільшення біосинтезу білка і прискорення розвитку клітин [39]. Тобто, нетривала дія ультразвукового опромінення частотою 20 кГц призводить до підвищеного продукування біомаси. Це підтверджується підвищенням оптичної густини у 10 разів по відношенню до контрольного дослідження (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

**Зміна оптичною густини суспензії клітин *Chlorella vulgaris* при дії  
ультразвукового опромінення**

Доба	Оптична густина			
	Контроль	20 кГц	22,5 кГц	25 кГц
1	0,025±0,00125	0,14±0,007	0,05±0,0025	0,025±0,00125
3	0,05±0,0025	0,25±0,0125	0,09±0,0045	0,029±0,00145
5	0,055±0,00275	0,445±0,02225	0,14±0,007	0,03±0,0015
8	0,073±0,00365	0,75±0,0375	0,35±0,0175	0,048±0,0024
10	0,075±0,00375	0,85±0,0425	0,36±0,018	0,049±0,00245
12	0,075±0,00375	0,95±0,0475	0,37±0,0185	0,05±0,0025
15	0,08±0,004	1±0,05	0,36±0,018	0,058±0,0029
17	0,09±0,0045	1±0,05	0,36±0,018	0,069±0,00345

Тривале опромінення або його висока потужність призводить до розриву мембрани внаслідок постійної деформації під дією ультразвуку і, відповідно, до загибелі клітин.

При опроміненні культури частотою 22,5 кГц (рис. 3.6) на відміну від дії частоти у 20 кГц, швидкість приросту клітин у експонентній фазі така ж, як і за стандартних умов. Збільшення концентрації клітин, по відношенню до нормальних умов відбувається за рахунок більш тривалої фази експонентного росту. Тобто підвищення частоти опромінення знижує приріст кількості клітин мікроводоростей. Оптична густина суспензії перестав змінюватись після 8 доби культивування на відміну від дії ультразвуку частотою 20 та 25 кГц (табл. 3.1). Це пов'язано зі збільшенням розмірів клітин, що впливає на розсіяння світла. При цьому кількість біомаси збільшується на 44% по відношенню до контрольного дослідження (рис. 3.7). Тобто, підвищення частоти опромінення за однакової тривалості його дії призводить до зниження приросту біомаси мікроводоростей.

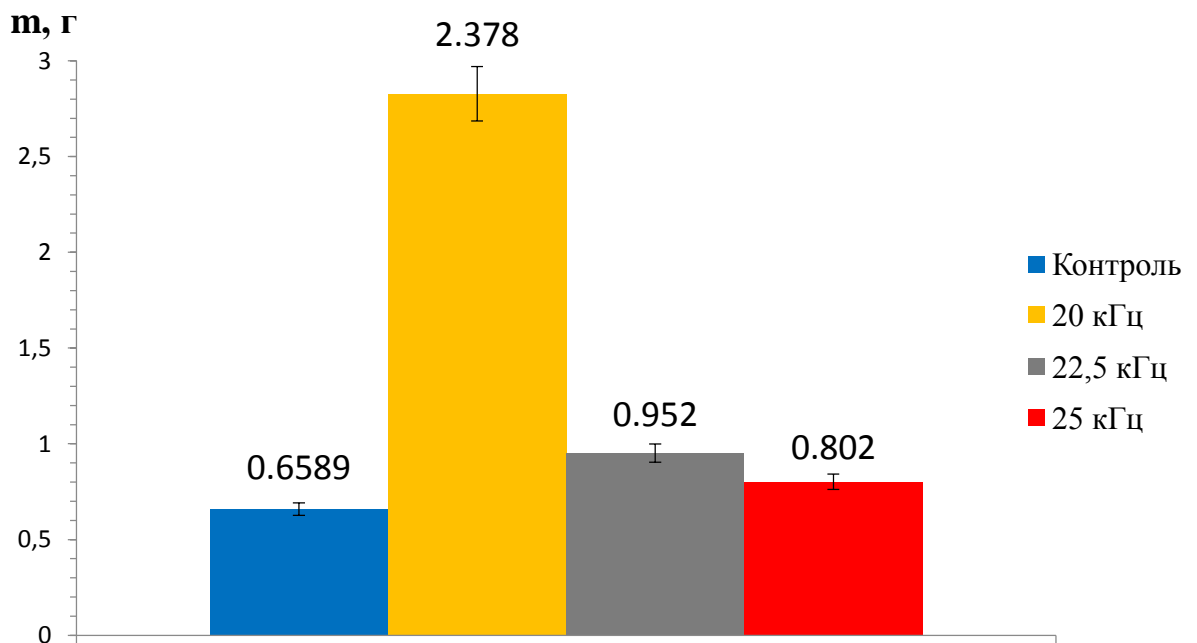


Рис. 3.7. Приріст біомаси мікроводоростей *Chlorella vulgaris* (m) за 30 діб культивування при дії ультразвукового опромінення різної частоти,  $P \leq 0,05$ .

За високої потужності опромінення можливе виникнення ефекту кавітації, що призводить до значних пошкоджень у клітині. Це підтверджується даними щодо приросту біомаси за дії частоти 25 кГц. На відміну від дії більш низьких частот при застосуванні опромінення частотою 25 кГц зменшується тривалість фази експонентного росту (рис. 3.6). В цьому випадку загальна кількість клітин знижується по відношенню до культури, яку опромінювали ультразвуком з більш низькими частотами, але перевищує приріст клітин за стандартних умов культивування. Це можна пояснити руйнівною дією таких частот на мембрани, що призводить до зниження швидкості фотосинтетичних процесів, і як наслідок, зменшення біосинтезу енергетичних сполук (АТФ), що у свою чергу призводить до уповільнення процесів біосинтезу білків і розвитку клітин.

Узагальнені дані дії ультразвукового опромінення різної частоти на приріст біомаси наведено на рис. 3.7. Як видно з рис. 3.7 дія ультразвукового опромінення частотою 20 ÷ 25 кГц призводить до підвищеного приросту біомаси мікроводоростей по відношенню до культивування на середовищі Громова №6 без опромінення. Максимальний приріст біомаси спостерігається при дії ультразвукового опромінення частотою 20 кГц. Підвищення приросту біомаси у 4,3 рази по відношенню до культивування мікроводорості *Chlorella vulgaris* без впливу ультразвуку дозволяє запропонувати опромінення ультразвуком частотою 20 кГц для інтенсифікації процесу культивування мікроводоростей у промислових масштабах [105]. Підвищення температури з 18 до 28 °С сприяє як приросту біомаси у 4,5 разів, так і ліпідної фракції у 2 рази при опроміненні частотою 20 кГц. Дія ультразвукового опромінення частотою 22,5 і 25 кГц також призводить до підвищеного приросту біомаси мікроводоростей на 44 та 21%, відповідно, порівняно з контролем. Але дія таких частот призводить до зменшення тривалості експонентної фази росту, порушенню структури мембран, що уповільнює швидкість продукування біомаси.



Продуктування ліпідної фракції *Chlorella vulgaris* в залежності від дії частоти ультразвукового опромінення за 30 діб культивування наведено на рис. 3.8. У відповідності до приросту біомаси мікроводоростей найбільшу кількість ліпідів за період культивування одержано за використання дії ультразвукового опромінення частотою 20 кГц. По відношенню до контрольного зразка маса ліпідів при дії опромінення частотою 20 кГц збільшується у 14,5 разів, при 22,5 кГц – у 8,4 рази, при 25 кГц – у 2,8 рази.

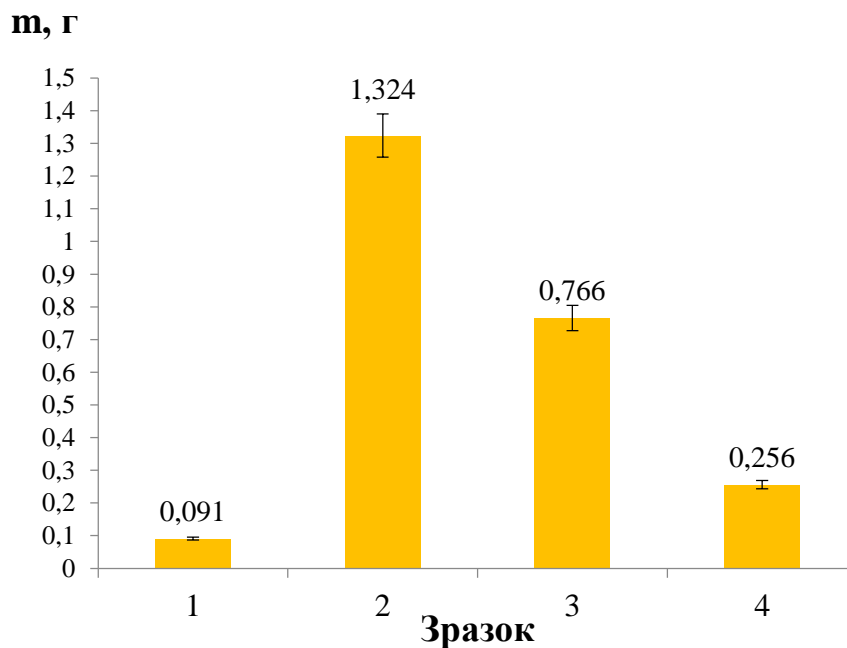


Рис. 3.8. Вихід ліпідної фракції (m) *Chlorella vulgaris* в залежності від дії ультразвукового опромінення частотою:

1 - контроль, 2 - 20 кГц; 3 - 22,5кГц; 4 - 25 кГц,  $P \leq 0,05$ .

На рис. 3.9 наведено питомий вміст ліпідів у сухій біомасі за 30 діб культивування. Так, найбільша масова частка ліпідів (80,46%) характерна для культури при опроміненні її ультразвуком частотою 22,5 кГц, що у 5,8 разів більша за контрольної культури (13,81%). При дії ультразвукового опромінення частотою 20 кГц масова частка ліпідів складає - 55,67%; при дії частоти 25 кГц - 31,92%, що у 4 та 2,3 разів більше, відповідно, по відношенню до стандартних умов культивування [119].

Незважаючи на те, що питомий вміст ліпідів при дії ультразвукового опромінення 22,5 кГц у 1,4 рази більший, ніж при опроміненні ультразвуком

частотою 20 кГц (рис.3.9), загальній вихід ліпідів у 1,7 разів більший при дії частоти у 20 кГц завдяки значному приросту біомаси за період культивування. Зменшення вмісту ліпідів при дії опромінення частотою 25 кГц можливо пов'язано як з уповільненням процесів біосинтезу, так і зі зміною напрямку метаболічних процесів на відновлення структури мембран, захист від радикалів тощо.

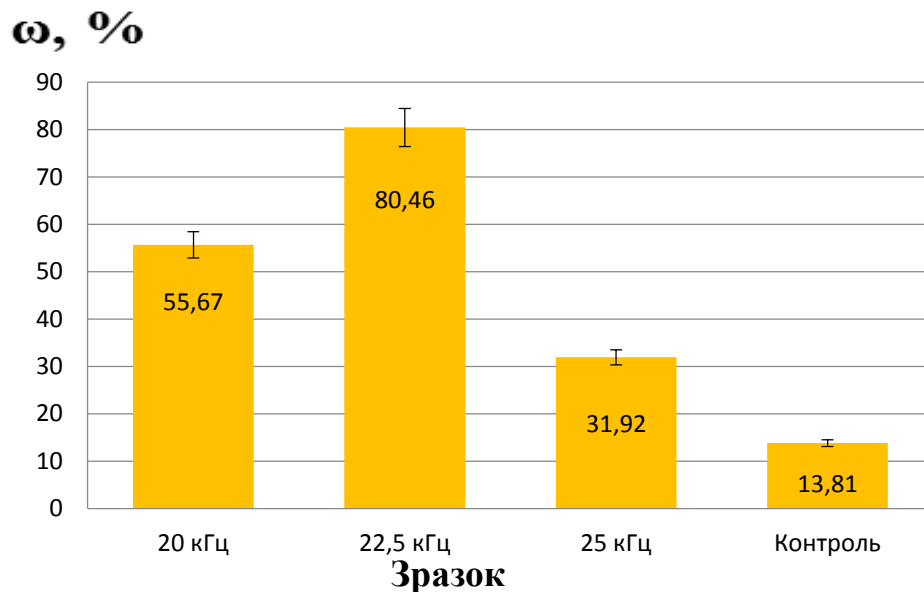


Рис. 3.9. Масова частка ліпідної фракції ( $\omega$ ) *Chlorella vulgaris* в залежності від дії ультразвукового опромінення частотою: 1 - контроль, 2 - 20 кГц; 3 - 22,5 кГц; 4 - 25 кГц,  $P \leq 0,05$ .

Таким чином, для культивування біомаси *Chlorella vulgaris* та продукування нею ліпідної фракції – сировини для отримання біодизельного палива раціональною порівняно з іншими частотами є дія ультразвукового опромінення частотою 20 кГц. Досягнення концентрації ліпідів 55% у клітинах мікрободоростей *Chlorella vulgaris* при дії ультразвукового опромінення частотою 20 кГц не є максимально можливим, але внаслідок більш інтенсивного приросту біомаси загальний вихід ліпідів за дії такої частоти є достатнім для створення технології одержання біодизельного палива.

## Висновки до розділу

1. Встановлено, що дія опромінення звуковими частотами  $5 \div 20$  кГц культури *Chlorella vulgaris* призводить до підвищеного у  $1,5 \div 3$  рази біосинтезу ліпідів у клітинах по відношенню до культивування на середовищі Громова №6, що дає змогу застосовувати опромінення для керованого синтезу ліпідної фракції – сировини для отримання біодизельного палива.

2. Показано, що використання опромінення культури частотами 5 та 20 кГц призводить до підвищеного приросту біомаси, на відміну від застосування частот у 10 та 15 кГц. Використання частот у 5 та 20 кГц є фактором, що дозволяє підвищити вихід біомаси *Chlorella vulgaris* і є підґрунтям для створення біотехнології культивування мікроводоростей.

3. Вперше встановлено, що дія опромінення ультразвуковим спектром частот 20 - 25 кГц протягом 1 хвилини при потужності  $5 \text{ Вт/см}^2$  призводить як до підвищеного приросту біомаси *Chlorella vulgaris*, так і до біосинтезу ліпідів. Питомий вміст ліпідів у клітинах досягає 80% за опромінення частотою 22,5 кГц. При підвищенні чи зниженні частоти опромінення вміст ліпідів зменшується до 55% при 20 кГц та 32% при 25 кГц. Дія опромінення ультразвуковими частотами дає змогу створити умови для зміни метаболізму клітин в бік утворення ліпідної фракції і можливості використання *Chlorella vulgaris* як продуцента сировини для отримання біодизельного палива.

4. Підвищення температури з 18 до 28 °C сприяє як приросту біомаси у 4,5 разів, так і ліпідної фракції у 2 рази при опроміненні частотою 20 кГц. Вихід ліпідної фракції за рахунок приросту біомаси у 2 рази вищий за використання частоти 20 кГц, ніж за частоти 22,5 кГц, питомий вміст ліпідів - 55 і 80%, відповідно. Це дає змогу запропонувати процес культивування проводити за температури 28 °C та опроміненні культури *Chlorella vulgaris* частотою у 20 кГц для одержання триацилгліцеролів – вихідної сировини для одержання біодизельного палива.

За результатами роботи, що надані в цьому розділі, опубліковано 2 статті: 1 у виданні, що входить до науко метричних баз Scopus та ін [117] та у фаховому виданні [119].

## РОЗДІЛ 4

### ДІЯ ЧАСТОТ ВИДИМОГО СПЕКТРУ НА РІСТ ТА РОЗВИТОК МІКРОВОДОРОСТЕЙ *CHLORELLA VULGARIS*

Розвиток клітин та швидкість приросту біомаси мікроводоростей залежить від надходження світлової енергії до клітини. Діапазон частот світлової енергії, її інтенсивність та режими подачі впливають не тільки на приріст біомаси, а і на біосинтез певних речовин, наприклад, таких як триацилгліцероли – сировини для отримання біодизельного палива [120]. Для створення технології культивування мікроводоростей у фотореакторах необхідно забезпечити рівномірне освітлення культури, особливо при недостатньому надходженні природного світла, або у період темряви.

За використання стандартних люмінесцентних ламп, що застосовуються для освітлення фотореакторів, витрати на електроенергію і недовговічність самих ламп призводять до підвищення собівартості процесу, і, відповідно, вартості кінцевого продукту. Слід зауважити, що люмінесцентне випромінювання має постійне визначене співвідношення різних довжин хвиль [121]. У той же час різні види водоростей мають різний набір і співвідношення фоточутливих пігментів у хлоропластах і, відповідно, переважно поглинають опромінення з визначеним спектром довжин хвиль. Так, для *Chlorella vulgaris* характерно поглинання світлової енергії з довжинами хвиль у діапазонах синього та червоного спектрів [122]. Тому з'ясування можливості використання світлодіодів з визначеним діапазоном випромінювання для заміни люмінесцентних ламп є актуальною задачею, вирішення якої дасть змогу знизити собівартість виробництва біодизельного палива з мікроводоростей.

Метою досліджень, яким присвячено розділ, є встановлення діапазонів, потужності, та співвідношення довжин хвиль видимого спектру для інтенсифікації розвитку *Chlorella vulgaris*.

#### 4.1 Вплив штучного опромінення частотами видимого спектру

Для визначення можливості використання світлодіодів з різними довжинами хвиль видимого спектру для забезпечення потреб мікродоростей в освітленні використовували реактори об'ємом 200 см<sup>3</sup>.

Культивування *Chlorella vulgaris* проводили за використання лабораторної установки, яка запобігала надходженню сонячного світла. Освітлення культури здійснювалось за допомогою комбінацій 10 або 20 світлодіодів: 1 - білі (колірна температура 5500 K), 2 - червоні/сині 3:2, 3 - сині/жовті/червоні/помаранчеві 2:2:5:1, відповідно, 4 - сині/червоні/зелені 1:1:1. Для останньої комбінації використовували 9 та 18 світлодіодів.

Діапазон спектру випромінювання обирали з урахуванням вмісту пігментів, що характерні для *Chlorella vulgaris* [123]. Хлорофіл *a* має максимуми поглинання при довжині хвилі 450 та 675 нм, для забезпечення таких діапазонів використовуються світлодіоди кольору індиго (430 ÷ 450 нм) та червоні (640 ÷ 700 нм). Для хлорофілу *b* характерно поглинання при 475 та 625 нм, якому відповідають сині (450 ÷ 480 нм) та помаранчеві (615 ÷ 625 нм) світлодіоди, хлорофіл *a*, який міститься у фотосистемі I і є первинним акцептором електронів, має максимум поглинання при 695 нм - кінець червоного спектру. Крім цих основних пігментів у клітині присутні також каротиноїди, максимуми поглинання яких знаходиться в діапазонах довжин хвиль 341 ÷ 451 нм та 520 ÷ 580 нм, що відповідає світлодіодам спектру ультрафіолету типу A (320 ÷ 395 нм), фіолетовому (395 ÷ 430 нм), індиго (430 ÷ 450 нм), зеленому (520 ÷ 555 нм) та жовто-зеленому (555 ÷ 585 нм).

Отже, теоретично для оптимального розвитку культури мікродоростей потрібно використовувати світлодіоди зі спектрами випромінювання, що відповідають довжинам хвиль поглинання пігментів. Оскільки у білому світлі присутні усі довжини хвиль, то білі світлодіоди обрані для порівняння з впливом інших комбінацій довжин хвиль. Виходячи з того, що комбінація червоних та синіх світлодіодів відповідає поглинанню

основного пігменту хлоропластів - хлорофілу *a*, то її запропоновано як основу, до якої додавали інші світлодіоди з різними довжинами хвиль. Такий вибір пояснюється можливістю впливу опромінення на усі пігментні системи клітини.

На рис. 4.1 наведено зміну оптичної густини суспензії в процесі культивування *Chlorella vulgaris*.

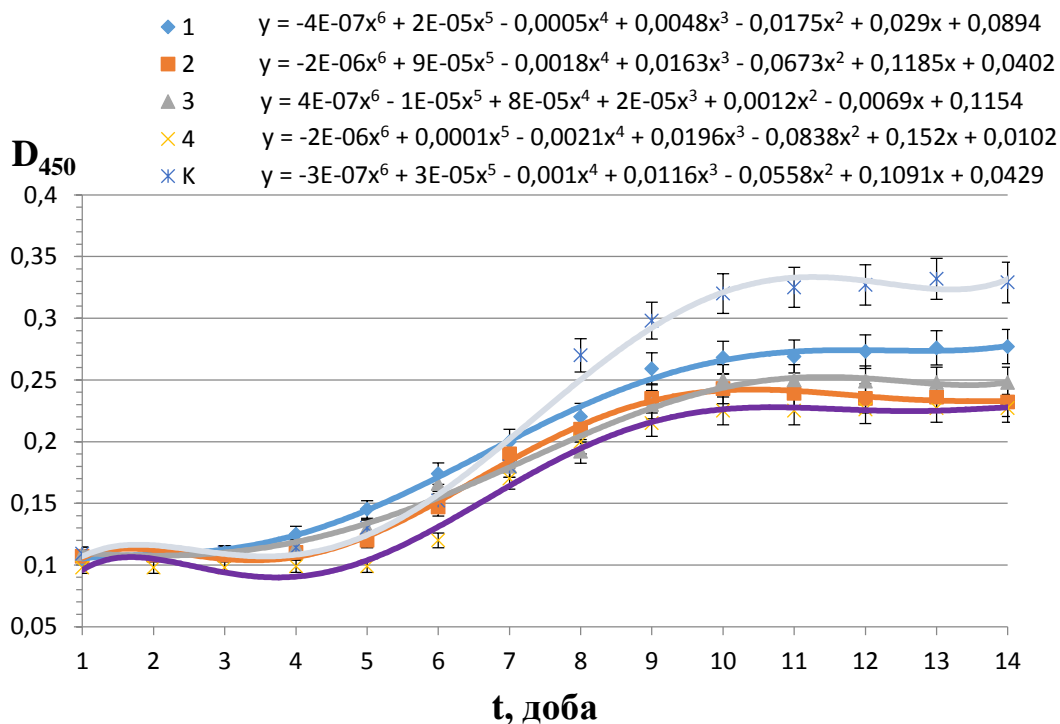


Рис. 4.1. Зміна оптичної густини ( $D_{450}$ ) суспензії клітин у процесі культивування *Chlorella vulgaris* при освітленні 10 світлодіодами з різними довжинами хвиль:

1 - білі, 2 - сині/червоні (2:3), 3 - сині/жовті/червоні/помаранчеві (2:2:5:1), відповідно, 4 - сині/червоні/зелені (1:1:1), К - природне освітлення,  $P \leq 0,05$ .

За перші 6 діб найбільша зміна густини спостерігається для культури, де освітлення проводили світлодіодами з білим спектром (1) та комбінаціями: червоного/синього (2), червоного/синього/жовтого/помаранчевого (3). У цей період відбувається адаптація клітин до зміни спектру освітлення та зниження його інтенсивності при застосуванні світлодіодів у порівнянні з природним освітленням, зміни температурного режиму з 30 °С до 20 °С. У фазі

експонентного росту максимальний приріст характерний для природного освітлення.

На рис. 4.2 наведено зміну відносного приросту кількості клітин *Chlorella vulgaris* при культивуванні за використання різних спектрів опромінення. Динаміка зміни приросту клітин корелює зі зміною оптичної густини суспензії.

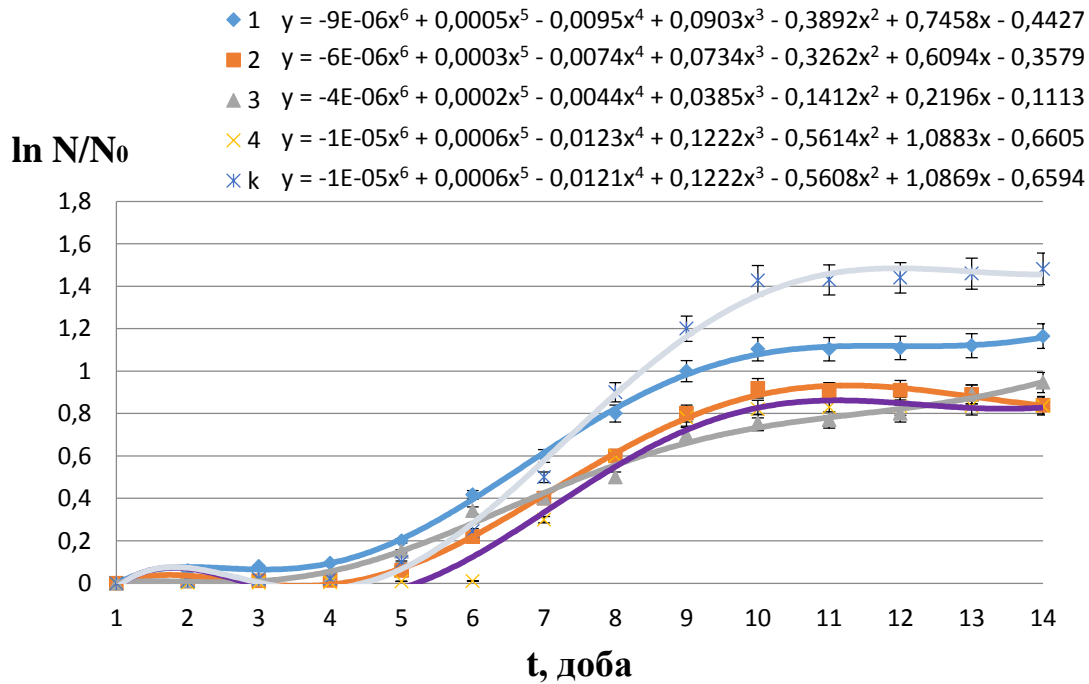


Рис. 4.2. Динаміка зміни кількості клітин *Chlorella vulgaris* ( $\ln N/N_0$ ) у процесі культивування (t) під дією освітлення 10 світлодіодами з різними довжинами хвиль:

1 - білі, 2 - сині/червоні (2:3), 3 - сині/жовті/червоні/помаранчеві (2:2:5:1), відповідно, 4 - сині/червоні/зелені (1:1:1), к - природне освітлення,  $P \leq 0,05$ .

У залежності від довжин хвиль видимого спектру, що використовували, змінюються розміри клітин та їх забарвлення. Так, при вирощуванні культури під дією опромінення білим світлом (1) клітини мали жовтувато-зелене забарвлення та найменший розмір -  $2,5 \div 2,7$  мкм. При культивуванні під дією сонячного світла клітини збільшуються в розмірі і досягають  $2,8 \div 3,1$  мкм. При цьому клітини, які вирощені за використання природного освітлення і



освітлення білим світлом, не злипаються і не створюють колоній. При використанні освітлення комбінаціями світлодіодів червоного/синього (2) та синього/жовтого/червоного/помаранчевого (3) кольорів клітини мають зелений колір, їх розмір збільшується і досягає  $3,7 \div 6,2$  мкм. При цьому їх кількість у процесі культивування зменшується по відношенню до кількості клітин при освітленні культури природним світлом, (рис. 4.2). За використання таких комбінацій довжин хвиль у спектрах опромінення клітини утворюють нитчасті та колоподібні колонії, виділення з яких окремих клітин відбувається лише під дією вуглекислого газу. У випадку використання комбінації світлодіодів синього/червоного/зеленого кольорів (4) клітини мали найбільший розмір  $7,5 \div 10$  мкм, що перевищував в середньому у 3 рази розмір клітин, які вирощували при освітленні білими світлодіодами. Клітини мали насичений зелений колір, місцями темнозелений, скупчувалися у великі хлоп'єподібні структури, які не руйнувались при перемішуванні.

На рис. 4.3 наведено приріст біомаси за 14 діб культивування за застосування освітлення різними комбінаціями світлодіодів та різної інтенсивності. При низькій інтенсивності освітлення (10 світлодіодів) максимальний приріст біомаси характерний для природного освітлення. По відношенню до природного освітлення за використання комбінації спектрів синього/червоного/зеленого світлодіодів приріст біомаси зменшується на 11%, комбінації синього/жовтого/червоного/помаранчевого - на 33%, білого - на 22%, червоного/синього - на 45%.

Розбіжності у прирості біомаси (рис. 4.3) та показниками оптичної густини суспензії (рис. 4.1) можна пояснити різними розмірами клітин та їх угрупованням при застосуванні різного освітлення.

Так, більший приріст біомаси і меншу оптичну густину у випадку застосування комбінації синього/червоного/зеленого освітлення можна пояснити більшими розмірами клітин, меншою їх кількістю та їх скупченням, оскільки зміна розміру і кількості клітин впливає на розсіювання і, відповідно, на значення оптичної густини.

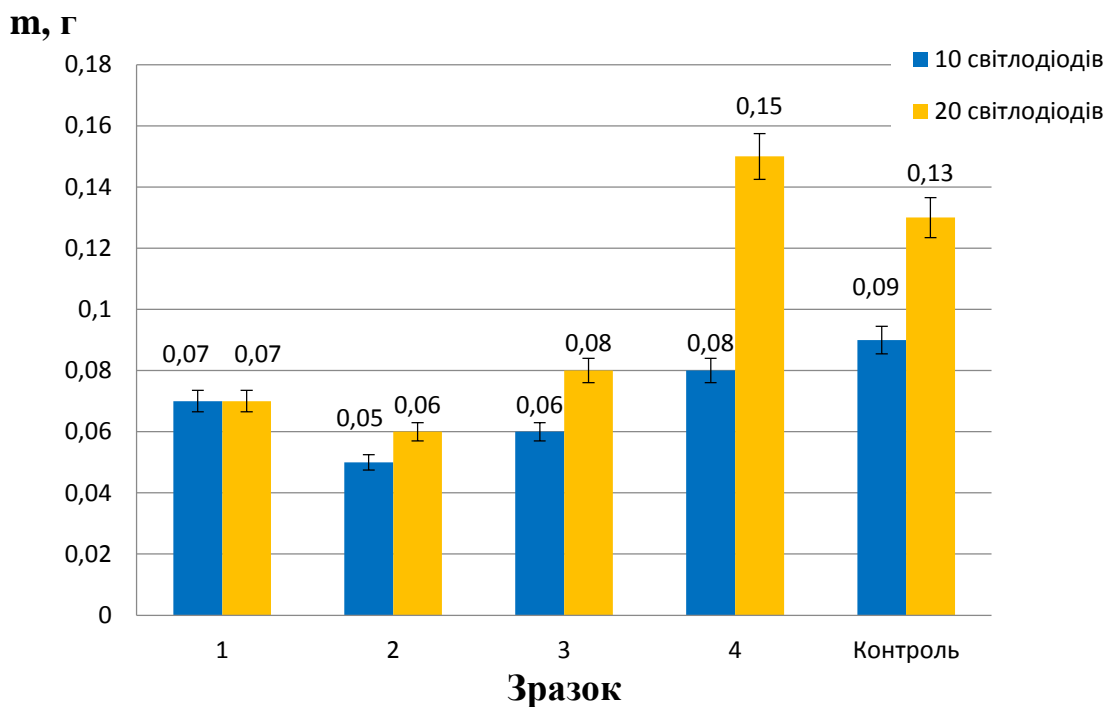


Рис. 4.3. Вихід біомаси *Chlorella vulgaris* (m) за 14 діб культивування при освітленні комбінаціями світлодіодів за низької інтенсивності (10 світлодіодів, сині стовпчики) та високої (20 світлодіодів, жовті стовпчики):

1 - білі, 2 - сині/червоні (2:3), 3 - сині/жовті/червоні/помаранчеві (2:2:5:1), відповідно, 4 - сині/червоні/зелені (1:1:1), контроль - природне освітлення,  $P \leq 0,05$ .

Також підвищення приросту біомаси у випадку використання світлодіодної системи сині/червоні/зелені по відношенню до застосування інших комбінацій світлодіодів пояснюється наявністю випромінювання, що характерно для зеленого кольору. Зелене освітлення сприяє фіксації  $\text{CO}_2$  клітинами в глибині фотореактора та збільшує швидкість його перетворення в органічні речовини, що сприяє приросту біомаси [64]. Тобто, використання комбінації світлодіодів, яка містить у рівному співвідношенні світлодіоди, що відповідають опроміненню довжинам хвиль червоного, синього на зеленого спектру, є більш продуктивною, ніж використання освітлення білими світлодіодами.

Зменшення приросту біомаси за використання 10 світлодіодів у порівнянні з природним освітленням можливо пов'язане з недостатністю потужності освітлення, що використовували. Оскільки за використання сонячного освітлення клітини одержували у  $1,5 \div 2$  рази більше енергії, ніж за використання світлодіодів. Цим також можна пояснити і збільшення розмірів клітин за використання комбінації світлодіодів різних кольорів, оскільки фотони різних кольорів мають різну енергію, і відповідно, її кількість впливає на фотосинтетичні процеси. Так, зелений фотон (510 нм) має на 20% більше енергії, ніж червоний (680 нм) і на 15,5% менше, ніж синій (470 нм). Тобто введення опромінення з низькими довжинами хвиль видимого діапазону буде сприяти підвищеному синтезу біомаси.

Підвищення енергії освітлення удвічі (20 світлодіодів) підвищує приріст біомаси у випадку використання усіх комбінацій світлодіодів, окрім білих (рис. 4.3). Однаковий приріст біомаси при збільшенні кількості білих світлодіодів можливо пояснити високою потужністю освітлення малої поверхні фотореактора, що призводить до зниження інтенсивності розвитку культури і загибелі клітин мікроводоростей. Залежність приросту біомаси за використання різних комбінацій світлодіодів залишається такою ж, як і при меншій інтенсивності випромінювання, окрім комбінації синього/червоного/зеленого (позиція 4 на рис. 4.3). За таких частот освітлення приріст біомаси перевищує кількість біомаси, що одержана при природному освітленні (сонячні дні) на 15%.

Наведені результати суперечать висновкам, що одержані іншими авторами [92 - 96], де максимальний приріст біомаси характерний для освітлення білими або синіми світлодіодами. Таку розбіжність можна пояснити різною інтенсивністю опромінення, що застосовували у роботах. Оскільки червоний спектр має знижену інтенсивність і, відповідно, для одержання коректних зіставлених результатів необхідно використовувати для них більшу потужність.

Колір клітин та їх біосинтетичну активність можна пояснити зміною вмісту хлорофілів *a* та *b* при дії освітлення різної частоти. Відомо [64], що кількість хлорофілу не має прямо пропорційної залежності з перебігом реакцій дихання і фотосинтезу, але завжди його кількість підвищується при недостатньої інтенсивності освітлення, що підтверджують дані наведені в табл. 4.1.

У табл. 4.1 наведено дані зміни вмісту хлорофілів *a* та *b* при вирощуванні мікроводоростей при різному освітленні культури. Так, кількість хлорофілу *a* при застосуванні природного освітлення та білих світлодіодів однаково, але в останньому випадку збільшується кількість хлорофілу *b*. Використання комбінацій світлодіодів з перевагою червоного кольору (табл.4.1, позиції 2, 3) призводить до підвищеного вмісту хлорофілу *a* по відношенню до контролю у 1,9 та 2,6 разів та хлорофілу *b* у 2,2 та 4,5 разів, відповідно.

Таблиця 4.1

**Вміст хлорофілів *a* та *b* у клітинах *Chlorella vulgaris* при культивуванні при дії освітлення різними довжинами хвиль**

Зразок, №	Світлодіоди (20 шт)	Хлорофіл <i>a</i> , мг/г	Хлорофіл <i>b</i> , мг/г	Співвідношення хлорофілу <i>a/b</i>
1	Білі	10,34±0,31	4,01±0,1	2,58±0,2
2	Червоні/сині, (3:2)	19,34±0,58	3,40±0,1	5,69±0,2
3	Сині/жовті/червоні/пома-ранчеві, (2:2:5:1)	26,79±0,80	6,91±0,2	3,88±0,2
4	Червоні/сині/зелені, (1:1:1) (18 шт)	9,81±0,29	0,314±0,01	31,2±0,2
Конт роль	Природне освітлення	10,29±0,31	1,51±0,05	6,81±0,2

Підвищення вмісту хлорофілів по відношенню до клітин, що вирощені при дії природного освітлення, можна пояснити низькою інтенсивністю світла, що надають такі комбінації світлодіодів. У той же час застосування комбінації світлодіодів червоного/синього/зеленого кольорів (табл. 4.1, позиція 4) знижує

біосинтез хлорофілу *b* по відношенню до природного освітлення у 4,8 рази, що змінює забарвлення клітин до насиченого зеленого кольору.

Таким чином, для зниження енерговитрат та собівартості біодизельного палива, що одержано з мікроводоростей, для вирощування біомаси можливо використовувати як природне освітлення, так і комбінації світлодіодів. Для досліджених співвідношень світлодіодів з різними довжинами хвиль та інтенсивністю найбільший приріст біомаси мікроводорості *Chlorella vulgaris* характерний для використання комбінації світлодіодів трьох довжин хвиль - синього, зеленого та червоного у рівному співвідношенні при потужності опромінення 13,8 Вт та інтенсивності освітлення - 952 люкс. Червоні світлодіоди забезпечують енергією хлорофіл *a*, сині - хлорофіл *b*, зелені - підвищують засвоєння CO<sub>2</sub>. Такий спектр освітлення та інтенсивність призводить до збільшення розмірів клітин, що при однаковій швидкості їх подвоєння призводить до збільшеного приросту біомаси.

#### 4.2 Визначення раціонального співвідношення світлодіодів синього, червоного та зеленого спектрів для одержання максимального приросту біомаси *Chlorella vulgaris*

Для дослідження використовували фотореактор з ерліфтною системою, що забезпечує масообмінні процеси. Перемішування здійснювали повітрям, яке подавали у фотореактор зі швидкістю 0,6 дм<sup>3</sup>/хв. Барботування CO<sub>2</sub> проводили раз на добу - 0,3 дм<sup>3</sup>/дм<sup>3</sup>, температура культивування - 28 ± 2 °С. Опромінення світлодіодами проводили протягом 24 год. Для охолодження системи освітлення світлодіоди відключали на 10 хв. через кожні чотири години. Початкова оптична густина суспензії мікроводоростей D<sub>450</sub> складала 0,450 ± 0,01, що відповідає вмісту 11907429 ± 217600 клітин в см<sup>3</sup>.

На рис. 4.4 наведено зміну оптичної густини суспензії у процесі культивування мікроводоростей за використання різних комбінацій світлодіодів червоного, синього та зеленого діапазонів. Як видно з рис. 4.4

найбільшу оптичну густину культура мікроводоростей *Chlorella vulgaris* має при освітленні комбінацією світлодіодів червоні/сині/зелені у співвідношенні 2:1:1. На 12 добу культивування оптична густина суспензій мікроводоростей при освітленні різними комбінаціями світлодіодів набуває постійного значення. При максимальній кількості синіх світлодіодів (комбінація №3) значення оптичної густини не змінюється починаючи з 2 доби.

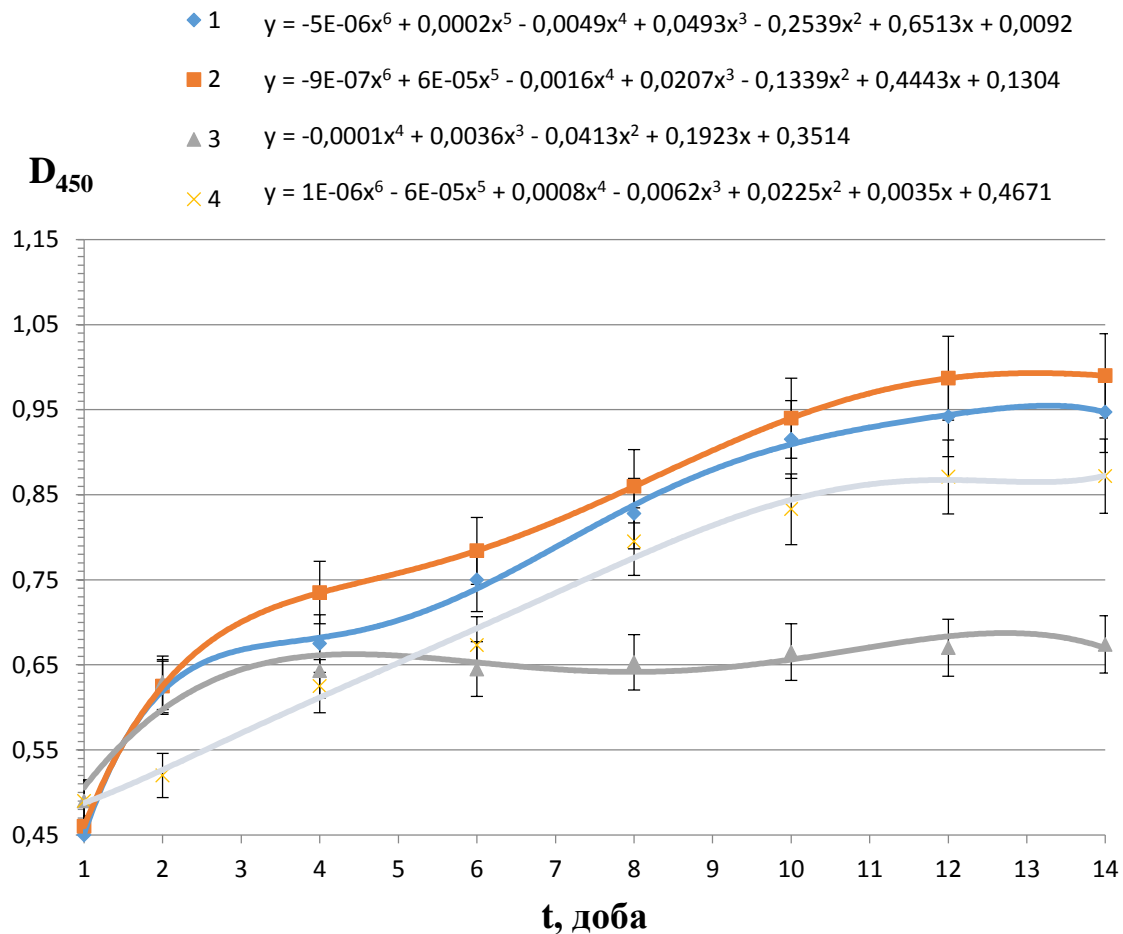


Рис. 4.4. Зміна оптичної густини ( $D_{450}$ ) суспензії клітин у процесі культивування *Chlorella vulgaris* (t) при освітленні природним та штучним (40 шт. світлодіодів) світлом за використання комбінацій у співвідношенні червоні/сині/зелені:

1 - (1:1:1), 2 - (2:1:1), 3 - (1:2:1), 4 - (1:1:2),  $P \leq 0,05$ .

Аналогічні криві характерні для динаміки зміни приросту клітин мікроводоростей, які наведено на рис. 4.5.

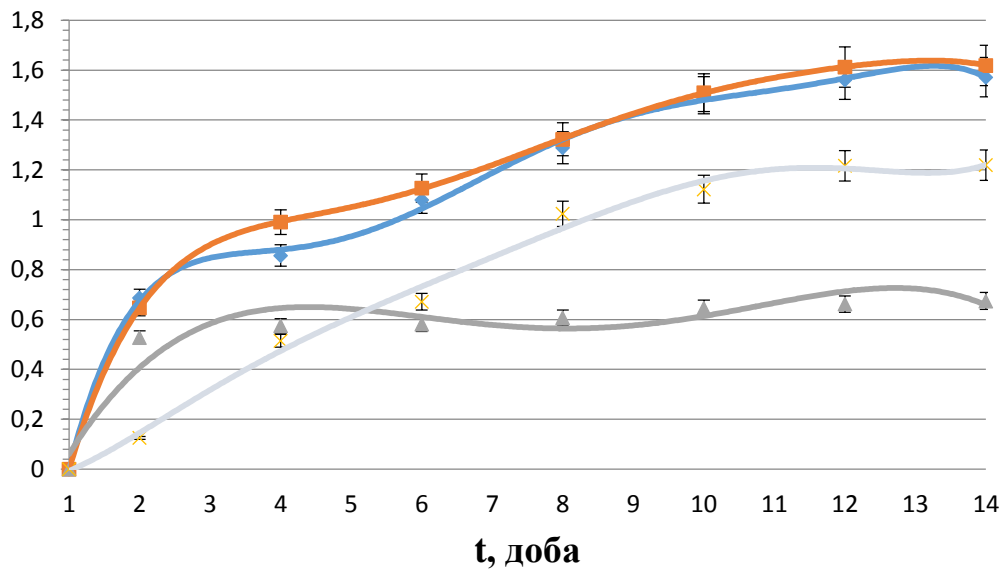
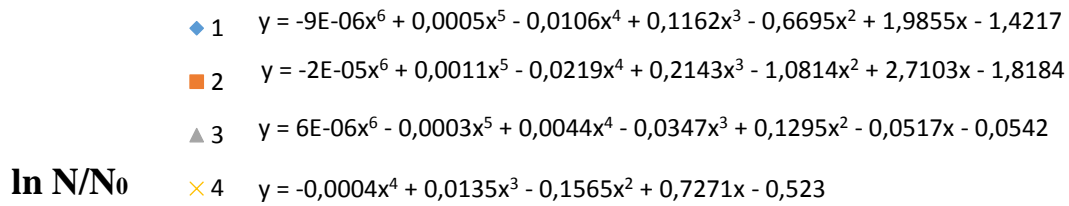


Рис. 4.5. Динаміка зміни кількості клітин *Chlorella vulgaris* ( $\ln N/N_0$ ) у процесі культивування при освітленні штучним (40 шт. світлодіодів) світлом за використання комбінацій у співвідношенні червоні/сині/зелені:

1 - (1:1:1), 2 - (2:1:1), 3 - (1:2:1), 4 - (1:1:2),  $P \leq 0,05$ .

При освітленні з перевагою спектру, що відповідає синьому кольору (рис. 4.4 та 4.5, зразок №3), з часом культивування не змінюється густина суспензії та приріст клітин. Таку поведінку *Chlorella vulgaris* можна пояснити негативним впливом високої інтенсивності низьких частот видимого спектра, що притаманно синьому освітленню. При цьому кількість енергії, що надходить до клітини, знижується за рахунок зменшення дії частот, характерних для фотосистем I та II, і, відповідно, знижується біосинтез хлорофілу *a*, що відповідає за поглинання довжини хвилі у 450 нм, за який проводили виміри на спектрофотометрі. Також при перевазі довжин хвиль

синього опромінення дуже швидко утворюються колонії, що впливає на визначення показника приросту клітин.

При мікроскопічному дослідженні виявлено, що при вирощуванні культури під дією опромінення комбінацією червоні/сині/зелені у співвідношенні 1:1:1 (1) клітини були зеленими діаметром  $7 \div 8$  мкм (іноді присутні великі клітини 10 мкм). Всі клітини зібрані в колоподібні або нитчасті колонії, виділення з яких окремих клітин відбувалось лише під дією вуглекислого газу. За використання освітлення комбінаціями світлодіодів у співвідношенні 2:1:1 (2) та 1:2:1 (3), відповідно, червоного, синього та зеленого кольорів клітини були темно-зеленого кольору такого ж розміру як і при освітленні комбінацією світлодіодів у співвідношенні червоні/сині/зелені 1:1:1 (1). При цьому нитчасті та колоподібні колонії були дещо більшого розміру, ніж при освітленні комбінацією світлодіодів червоні/сині/зелені 1:1:1. При культивуванні мікродоростей за використання комбінації світлодіодів з перевагою зеленого кольору - червоні/сині/зелені у співвідношенні 1:1:2 (4) діаметр клітин був  $5 \div 7$  мкм. Клітини мали жовтувато-зелений або світло-зелений колір, колоподібні колонії мали рвані краї.

На рис. 4.6 наведено приріст біомаси *Chlorella vulgaris* за 14 діб культивування під дією різних комбінацій світлодіодів червоного, синього та зеленого спектрів випромінювання. Найбільший вихід біомаси  $0,51$  г/дм<sup>3</sup> культурального середовища характерний для культури, яку вирощували при освітленні комбінацією світлодіодів з перевагою червоного спектру (рис. 4.6, поз. 2). За рівного співвідношення світлодіодів червоні/сині/зелені (рис. 4.6, поз. 1) вихід біомаси складав 76% від біомаси, одержаної з перевагою червоного кольору. Збільшення синіх світлодіодів призводить до зниження приросту біомаси на 33% (рис. 4.6, поз. 3), а зелених – у 2,5 рази (рис. 4.6, поз. 4). Таку залежність можна пояснити тим, що червоне опромінення постачає енергію для роботи хлорофілу *a*, який входить до складу обох фотосистем [124].



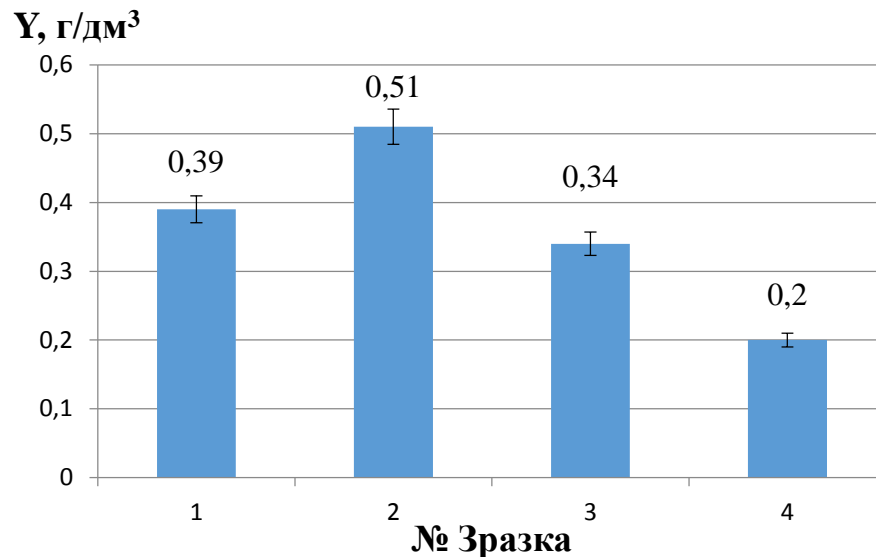


Рис. 4.6. Вихід біомаси *Chlorella vulgaris* (Y) за 14 діб культивування при освітленні природним та штучним (40 шт. світлодіодів) світлом за використання комбінацій у співвідношенні червоні/сині/зелені:

1 - (1:1:1), 2 - (2:1:1), 3 - (1:2:1), 4 - (1:1:2),  $P \leq 0,05$ .

Такі відмінності у виході біомаси пов'язані з тим, що хлорофіл *a* - основний фотосинтетичний пігмент, має високу спорідненість до світла червоного спектру. Тому збільшення кількості червоних світлодіодів з довжиною хвилі, що характерна для хлорофілу *a*, призводить і до підвищення біосинтетичних процесів клітини і, відповідно, до збільшення швидкості накопичення біомаси. Збільшення синіх світлодіодів у комбінації призводить до зростання активності хлорофілу *b*, але цей хлорофіл є додатковим пігментом, який передає частину енергії збудження на хлорофіл *a*, енергія якого безпосередньо внаслідок послідовних реакцій у фотосистемах приймає участь в утворенні багатих на енергію сполук - АТФ. Відповідно, підвищення кількості синіх світлодіодів і зменшення червоних призводить до зменшення приросту біомаси (рис. 4.6, поз. 3), що не відповідає висновкам робіт [90, 94, 120, 121]. У випадку використання комбінації з більшою кількістю зелених світлодіодів (рис. 4.6, поз. 4) низький вихід біомаси пов'язаний з нестачею енергії синього та червоного світла для хлорофілів *a* і *b*, відповідно. В той же

час використання світлодіодів зеленого кольору дає можливість частково подолати проблему зон затемнення, оскільки зелений квант має більшу енергію і здатний проникати глибше у густу суспензію на відміну від квантів червоного спектру та обмежено підтримувати роботу хлорофілу *a*.

Таким чином, для культивування мікроводоростей *Chlorella vulgaris* раціональним є співвідношення світлодіодів: червоні, сині, зелені (2:1:1), відповідно. При цьому потужність освітлення такою комбінацією світлодіодів повинна знаходитись в межах  $950 \pm 50$  Вт/дм<sup>3</sup>.

### Висновки до розділу

1. Приріст біомаси мікроводорості *Chlorella vulgaris* залежить від довжини хвилі опромінення і їх співвідношення. При недостатній інтенсивності освітлення світлодіодами максимальний приріст біомаси спостерігається за використання природного освітлення, спектр якого містить усі довжини хвиль видимого спектру. В той же час використання світлодіодів білого кольору, який також містить усі довжини хвиль як і сонячне випромінювання, показує нижчий на 11% приріст біомаси по відношенню до комбінації світлодіодів синій/зелений/червоний (1:1:1).

2. Використання комбінацій світлодіодів різної довжини хвилі призводить до збільшення розміру клітин і їх агрегації по відношенню до опромінення білим або сонячним світлом, що може впливати на швидкість розвитку культури і надходженню енергії опромінення.

3. Опромінення комбінаціями світлодіодів з перевагою червоного кольору (синій/червоний 2:3; синій/жовтий/червоний/помаранчевий, 2:2:5:1) підвищує біосинтез хлорофілу *a* у 2 рази по відношенню до природного освітлення, що сприяє біосинтетичним процесам.

4. Найвищий приріст біомаси характерний для культивування мікроводорості *Chlorella vulgaris* за використання комбінації світлодіодів червоний/синій/зелений у співвідношенні 2:1:1 при інтенсивності освітлення

952 люкс. Використання такої комбінації світлодіодів окремо або разом з природнім світлом забезпечує високу фотосинтетичну активність мікроводоростей, що дозволяє збільшити вихід біомаси. Червоний та зелений спектр забезпечують енергією хлорофіл *a*, синій спектр - хлорофіл *b*, забезпечуючи збалансовану роботу фотосинтетичного апарату, що дає змогу підвищити швидкість засвоєння CO<sub>2</sub> та накопичення біомаси.

За дослідженням, що наведено в даному розділі, опубліковано статтю [124].

## РОЗДІЛ 5

### ВПЛИВ ДЖЕРЕЛА НІТРОГЕНУ НА РОЗВИТОК МІКРОВОДОРОСТЕЙ *CHLORELLA VULGARIS*

Мікродорості *Chlorella vulgaris* здатні до засвоєння як неорганічних (іони амонію, нітриту, нітрати), так і органічних (сечовина, амінокислоти тощо) сполук нітрогену, а також молекулярного азоту [125]. В залежності від джерела нітрогену та його кількості у середовищі змінюється метаболізм клітин мікродоростей [126, 127]. Стандартні середовища культивування найчастіше містять нітрат калію як живильну речовину, яка одночасно задовольняє потреби у нітрогені та калії. Відомо, що для переведення нітрогену з нітратної форми в амінну необхідно витратити енергію (6 молекул АТФ), за використання іонів амонію клітина на його засвоєння не витрачає енергію [128]. Потенційно цінними джерелами нітрогену являються  $\text{NH}_4\text{Cl}$  і сечовина ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ), вважається, що вихід біомаси вищий за використання сечовини [129 – 132]. Доведено [133], що мікродорості підвищують синтез ліпідів або вуглеводів при зниженні концентрації нітрогену у середовищі культивування, але не визначено раціональну концентрацію нітрогену в залежності від його джерела для отримання підвищеного синтезу ліпідної фракції *Chlorella vulgaris* без зниження швидкості приросту біомаси. Суперечливі дані щодо концентрації іонів амонію, яка необхідна для вирощування культури, оскільки надлишок призводить до зупинення розвитку і загибелі клітин [50 – 55, 134 – 136]. Також сумісне використання різних джерел нітрогену може призводити до синергізму і підвищити приріст біомаси та впливати на метаболізм клітин, змінюючи біосинтез в бік шуканої речовини. Комбінація джерел нітрогену може стати підґрунтям для подальшого використання органічних відходів для культивування біомаси мікродоростей, що дасть змогу знизити вартість сировини.

Одночасна дія на метаболізм клітин різних джерел нітрогену та ультразвукового опромінення може призвести до підвищення або зниження

темрів приросту біомаси та біосинтезу ліпідів, що буде впливати на розробку біотехнології культивування мікробіоджерела *Chlorella vulgaris* з метою отримання біодизельного палива.

Метою дослідження цього розділу є визначення джерела нітрогену, яке при дії ультразвукового опромінення на культуру *Chlorella vulgaris* дасть найбільший приріст біомаси та ліпідів.

### 5.1 Вплив джерела нітрогену на приріст біомаси *Chlorella vulgaris*

Як джерело нітрогену обрано сполуки:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{KNO}_3$ , сечовину та екстракт посліду птахів. Такий вибір обумовлено тим, що за використання іонів амонію відбувається закиснення середовища за рахунок вивільнення клітиною протонів при перенесенні іонів амонію до клітини [137]. За використання нітрат-іонів може відбуватись залуговування, тому використання нітрату амонію не повинно змінювати рН середовища. Сечовина також не змінює концентрацію іонів водню у середовищі. В той же час іони нітрату, амонію та сечовина містяться у посліді птахів, екстракт якого можливо використовувати як живильне середовище [138]. Температура середовища складала  $18 \pm 2$  °C. За природного освітлення.

Клітини культури *Chlorella vulgaris* попередньо вирощували на середовищі Громова № 6, яке містить нітратну форму нітрогену. На рис.5.1 наведено зміну оптичної густини, що відповідає приросту біомаси *Chlorella vulgaris*, в залежності від форми нітрогену живильного середовища. За використання посліду птахів швидкість приросту біомаси значно більша, ніж за використання інших джерел. Це можна пояснити тим, що послід містить не тільки різні форми нітрогену, а і органічні сполуки, за використання яких разом з  $\text{CO}_2$  (міксотрофні умови) підвищується приріст біомаси [139].

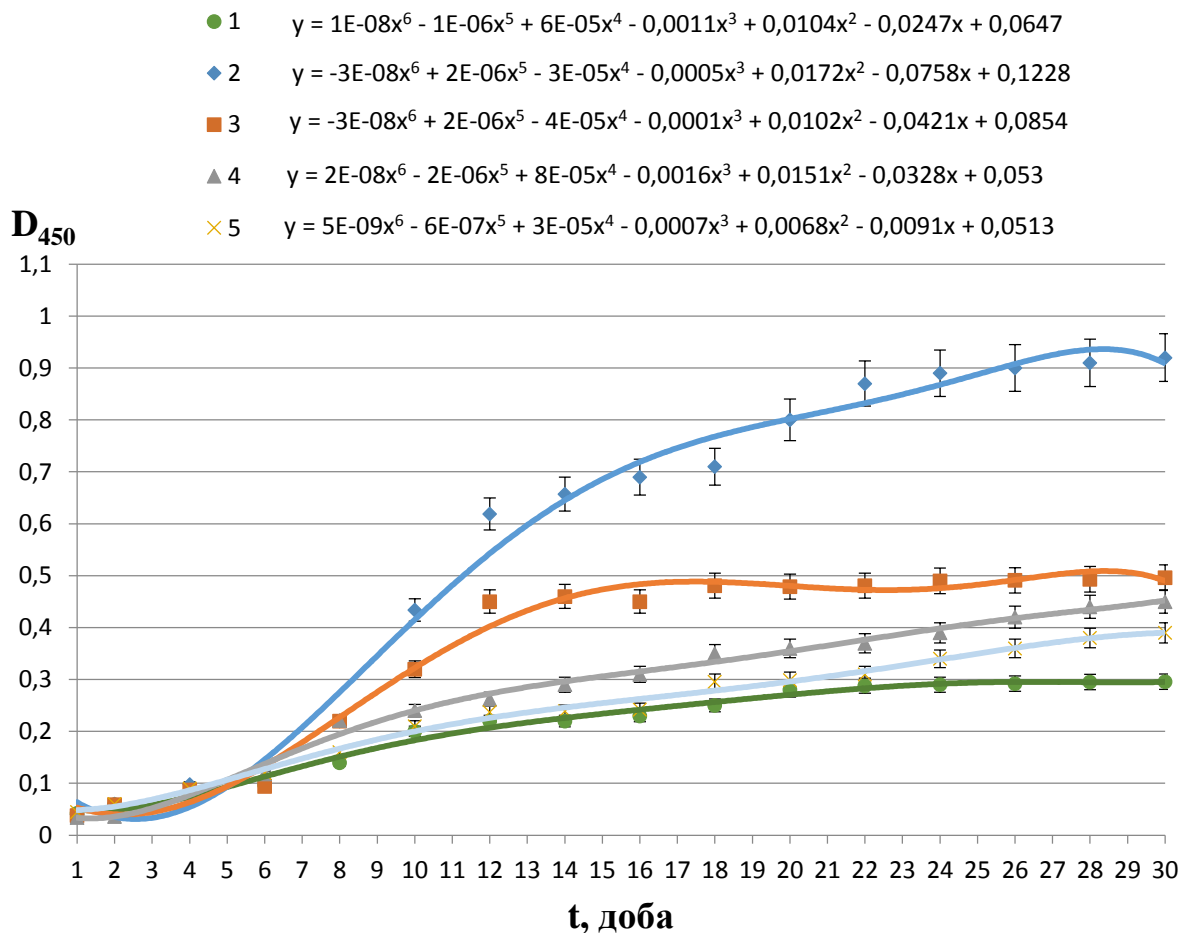


Рис. 5.1. Зміна оптичної густини ( $D_{450}$ ) культури *Chlorella vulgaris* при культивуванні ( $t$ ) в залежності від джерела нітрогену: 1 -  $KNO_3$ , 2 - екстракт посліду, 3 -  $NH_4Cl$ , 4 -  $CO(NH_2)_2$ , 5 -  $NH_4NO_3$ ,  $P \leq 0,05$ .

При перенесенні культури у середовище, що містить екстракт курячого посліду, спостерігається лаг-фаза протягом 3 діб, на одинадцяту добу культура виходить на стаціонарну фазу росту. При цьому за наявності у культуральному середовищі іонів нітрату та амонію *Chlorella vulgaris* споживає нітроген як у виді нітрат іону так і у виді іону амонію на стадії адаптації (лаг-фази) до змінних умов (табл. 5.1). Різке зниження концентрації нітрат іонів у лаг-фазі без приросту клітин можна пояснити накопиченням клітиною нітрогену для подальшого його використання для забезпечення клітини енергією (НАДН, АТФ тощо). Така ж поведінка характерна для клітин і за використання  $NH_4NO_3$ . Споживання переважно іону амонію як джерела нітрогену для

середовищ, що містять різні форми нітрогену, починається у фазі росту (табл. 5.1).  $\text{NH}_4^+$  є кінцевим продуктом відновлення нітрату і зворотним інгібітором, що репресує поглинання нітрату. За використання посліду зменшення споживання іонів амонію після 10 доби та збільшення їх концентрації після 20 доби культивування можна пояснити виділенням з клітин іону амонію за асиміляції сечовини з розчину [134]. Збільшення кількості нітрат іонів в останній період за використання  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  можливо відбувається за рахунок позбавлення клітиною їх надлишкової кількості, оскільки використання іону амонію для анаболізму потребує менших енергетичних витрат. За культивування *Chlorella vulgaris* на витяжці з посліду також збільшується фаза росту (до 8 – 10 діб).

Таблиця 5.1

**Зміна концентрації іонів нітрату та амонію при культивуванні *Chlorella vulgaris* на середовищах з різними джерелами нітрогену**

Доба	0		5		10		20		30	
Джерело нітрогену, мг/дм <sup>3</sup>	$\text{NO}_3^-$	$\text{NH}_4^+$	$\text{NO}_3^-$	$\text{NH}_4^+$	$\text{NO}_3^-$	$\text{NH}_4^+$	$\text{NO}_3^-$	$\text{NH}_4^+$	$\text{NO}_3^-$	$\text{NH}_4^+$
$\text{KNO}_3$	613,2 ±12		571,28 ± 11,4		544,36 ±10,5		502,8 ±10		455,5 ±9,1	
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	305,6 ±6,1	88,7 ±1,8	268,7 ±0,2	64,33 ±0,2	252,6 ±0,2	46,9 ±0,2	229,2 ±0,1	39,5 ±0,2	207,3 ±0,2	31,9 ±0,1
$\text{NH}_4\text{Cl}$		177,4 ±3,5		145,7 ±0,6		112,2 ±0,4		87,2 ±0,3		64,6 ±0,3
Екстракт посліду	117,4 ±2,3	78,0 ±1,6	99,3 ±2,0	51,4 ±1,0	85,2 ±1,7	36,0 ±0,7	75,6 ±1,5	8,52 ±0,2	28,9 ±0,6	12,2 ±0,2

Найбільший приріст біомаси характерний для середовища з екстрактом посліду птахів, більш повільний для середовища з  $\text{NH}_4\text{Cl}$  та сечовиною. Значно нижче накопичення біомаси спостерігається для середовища з  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  та стандартного середовища з  $\text{KNO}_3$  (рис. 5.1).

На початкових етапах культивування суспензія мікродоростей у середовищі з послідом та  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  мала найвищі показники приросту біомаси. Таку зміну приросту можна пояснити зміною рН середовища

(табл. 5.2). Так, перші 10 діб рН середовища з вмістом сечовини та посліду як джерела нітрогену складало  $7,5 \pm 0,1$ . В той час як для інших джерел -  $7,0 \pm 0,1$ . В процесі культивування значення рН середовища з послідом знижувалось до  $7,1 \pm 0,1$ , з сечовиною підвищувалось до  $8,4 \pm 0,05$ , в той час у середовищі з  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  знижувалось до  $6,5 \pm 0,05$ ; з  $\text{NH}_4\text{Cl}$  знижувалось до  $5,5 \pm 0,05$ ; з  $\text{KNO}_3$  підвищувалось до  $9,0 \pm 0,05$ . При цьому введення щодобово однакової кількості  $\text{CO}_2$  призводило до зниження значення рН на 0,5.

Таблиця 5.2

**Оптична густина та рН культуральних середовищ з різним вмістом джерела нітрогену на 30 добу культивування *Chlorella vulgaris***

Джерело нітрогену	Кількість клітин, • $10^7$ кл/см <sup>3</sup>	Густина, $D_{450}$	рН
$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	$11,9 \pm 0,05$	$0,45 \pm 0,02$	$8,4 \pm 0,3$
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	$0,88 \pm 0,04$	$0,39 \pm 0,02$	$6,3 \pm 0,5$
$\text{NH}_4\text{Cl}$	$14,6 \pm 0,07$	$0,496 \pm 0,03$	$5,5 \pm 0,3$
$\text{KNO}_3$	$0,34 \pm 0,03$	$0,296 \pm 0,01$	$9,2 \pm 0,1$
Екстракт посліду	$39,4 \pm 0,36$	$0,92 \pm 0,03$	$7,1 \pm 0,1$

Таким чином, на приріст біомаси *Chlorella vulgaris* впливає як джерело нітрогену, так і значення рН. Вплив рН середовища та джерела нітрогену необхідно розглядати сукупно. Оскільки, можливо концентрація іонів гідрогену по різному впливає на проникність мембран для різних джерел нітрогену. Зниження рН до 5,5 не впливає на розвиток *Chlorella vulgaris* при вирощуванні на середовищі з  $\text{NH}_4\text{Cl}$  як джерела нітрогену. При підвищенні рН > 8, що спостерігається у випадку використання сечовини, виникає загроза пошкодження клітин мікроводоростей вільним аміаком, що утворюється. Він може без перешкод проникати всередину клітин та руйнувати фотосистему II у тилакоїдах, тим самим порушуючи процеси фотосинтезу [140].

Як видно з табл. 5.2 найкращим джерелом нітрогену для культивування мікроводорості *Chlorella vulgaris* з метою подальшого накопичення нею



ліпідів є послід, хлорид амонію та сечовина. В той же час споживання клітинами іонів амонію може призвести до закиснення середовища (табл.5.2) і загибелі клітин. Оскільки використання  $\text{CO}_2$  як джерела карбону також призводить до зниження рН, то для запобігання цьому необхідно вводити як компоненти живильного середовища одночасно різні форми нітрогену, а саме -  $\text{NH}_4\text{Cl}$  та сечовину. Оскільки в цьому випадку не буде витрачатись енергетичний запас клітини на відновлення нітрогену, і амінний нітроген буде безпосередньо спрямовуватись на біосинтез. Саме співвідношення іонів амонію та сечовини характерно для екстракту з посліду, про що свідчить максимальний приріст біомаси за його використання. Слід зауважити, що однозначно не можна стверджувати, що підвищення біосинтезу пов'язано тільки зі співвідношенням різних форм нітрогену у посліді. Оскільки екстракт посліду також містить органічні форми карбону, що засвоюються, що також має позитивний вплив на вихід біомаси мікроводоростей [139, 141]. Тому необхідно з'ясувати як впливає співвідношення різних форм нітрогену у середовищі на вихід біомаси та ліпідів.

## 5.2 Вплив хімічних та фізичних параметрів на біосинтез ліпідів *Chlorella vulgaris*

Культивування мікроводоростей проводили при дії ультразвукового опромінення частотою 20 кГц (як раціональна для одержання ліпідів та приросту біомаси, розділ 3) за різних джерел нітрогену в середовищі. Як стандарт використовували середовище Громова №6 (нітратний нітроген), в інших зразках нітратний нітроген було замінено на  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , сечовину та суміш сечовини та хлориду амонію у співвідношенні за азотом 1:1. Опромінення здійснювали протягом 2 хвилин при потужності 5 Вт/см<sup>2</sup>. Культивування біомаси мікроводоростей проводили при температурі  $22 \pm 2$  °С. Контроль не піддавали дії ультразвуку.

Динаміку приросту біомаси *Chlorella vulgaris* (за зміною густини суспензії) за різного джерела нітрогену під дією опромінення ультразвукового спектру (20 кГц) наведено на рис. 5.2. Фаза уповільненого росту для усіх зразків триває протягом 6 діб, у випадку використання джерела нітрогену, що містить іони амонію ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  та суміш з сечовиною), крива має більший кут нахилу.

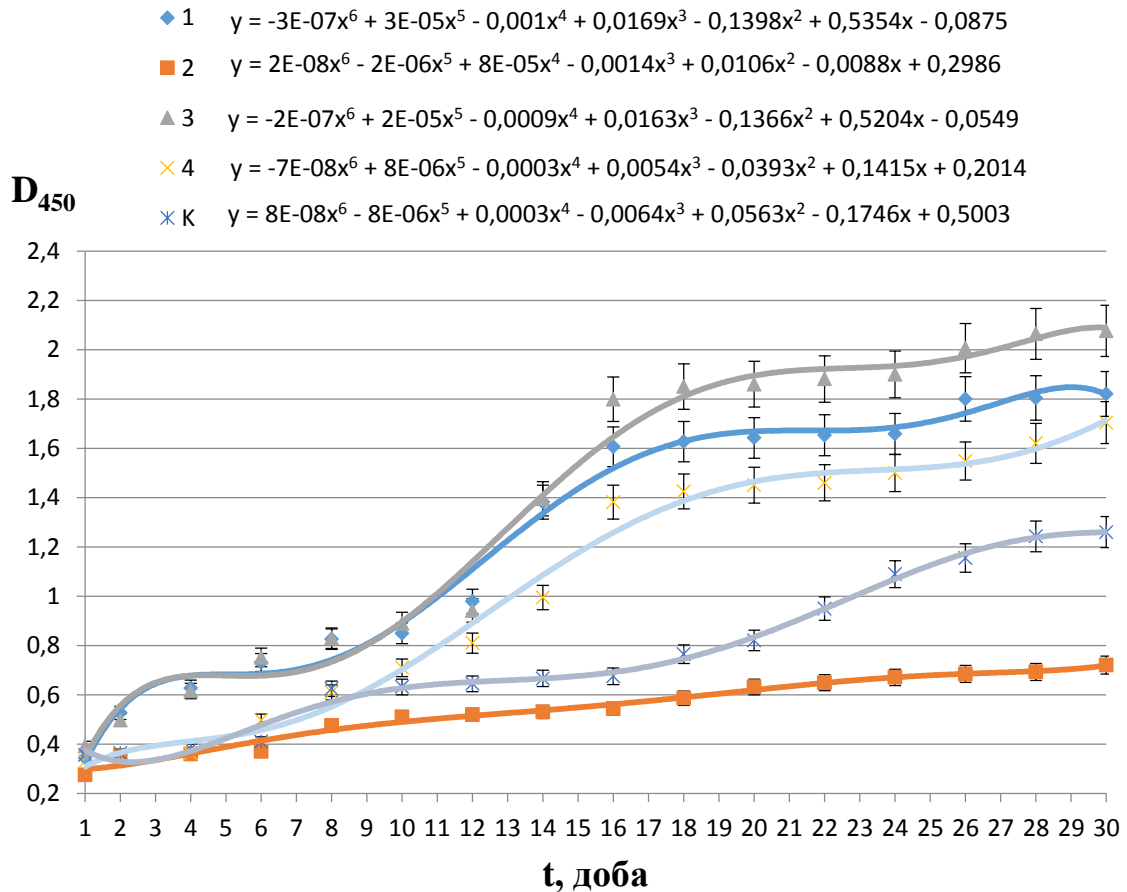


Рис. 5.2. Зміна оптичної густини ( $D_{450}$ ) суспензії культури *Chlorella vulgaris* в процесі вирощування (t) за різного складу середовища:

1 -  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 2 -  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ , 3 -  $\text{NH}_4\text{Cl}$  та  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  (1:1), 4 - Громова № 6, К - Громова № 6 без ультразвукового опромінення,  $P \leq 0,05$ .

Таку форму кривої можна пояснити енергетично незалежним використанням іонів амонію клітиною. Також за використання амонійного нітрогену збільшується термін фази експонентного росту. За використання суміші  $\text{NH}_4\text{Cl}$  та сечовини спостерігається найбільше зростання оптичної

густини. Це можна пояснити більш оптимальними значеннями рН для росту культури (рис.5.3).

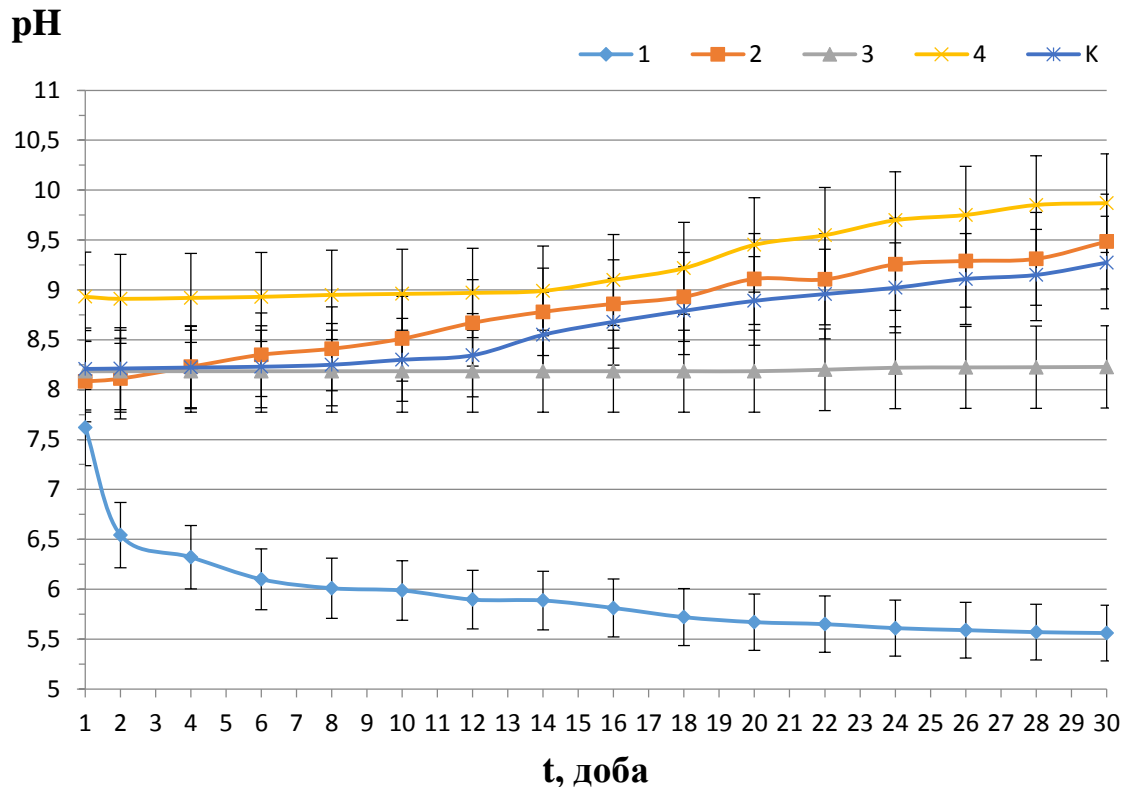


Рис. 5.3. Зміна рН середовища з часом (t) при культивуванні *Chlorella vulgaris* за різного джерела нітрогену в середовищі:  
 1 -  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 2 -  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ , 3 -  $\text{NH}_4\text{Cl}$  та  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  (1:1), 4 - Громова № 6, К - Громова № 6 без ультразвукового опромінення,  $P \leq 0,05$ .

На рис.5.4 наведено приріст клітин мікрободоростей. Більший приріст за використання середовища з іонами амонію можна пояснити впливом рН. Дія ультразвукового опромінення та форма джерела нітрогену, що засвоюється клітиною, впливає на форму клітин та формування колоній. Зниження рН за рахунок вивільнення протонів клітиною під час перенесення іонів амонію в клітину призводить до збільшення вільних клітин та повільного утворення колоній, що призводить до підвищеного приросту клітин та густини суспензії (рис. 5.2, 5.4). За використання нітратів та сечовини рН зміщується в лужну область, що сприяє утворенню колоній, які важко зруйнувати, що у свою чергу призводить до менших значень оптичної густини та приросту клітин.

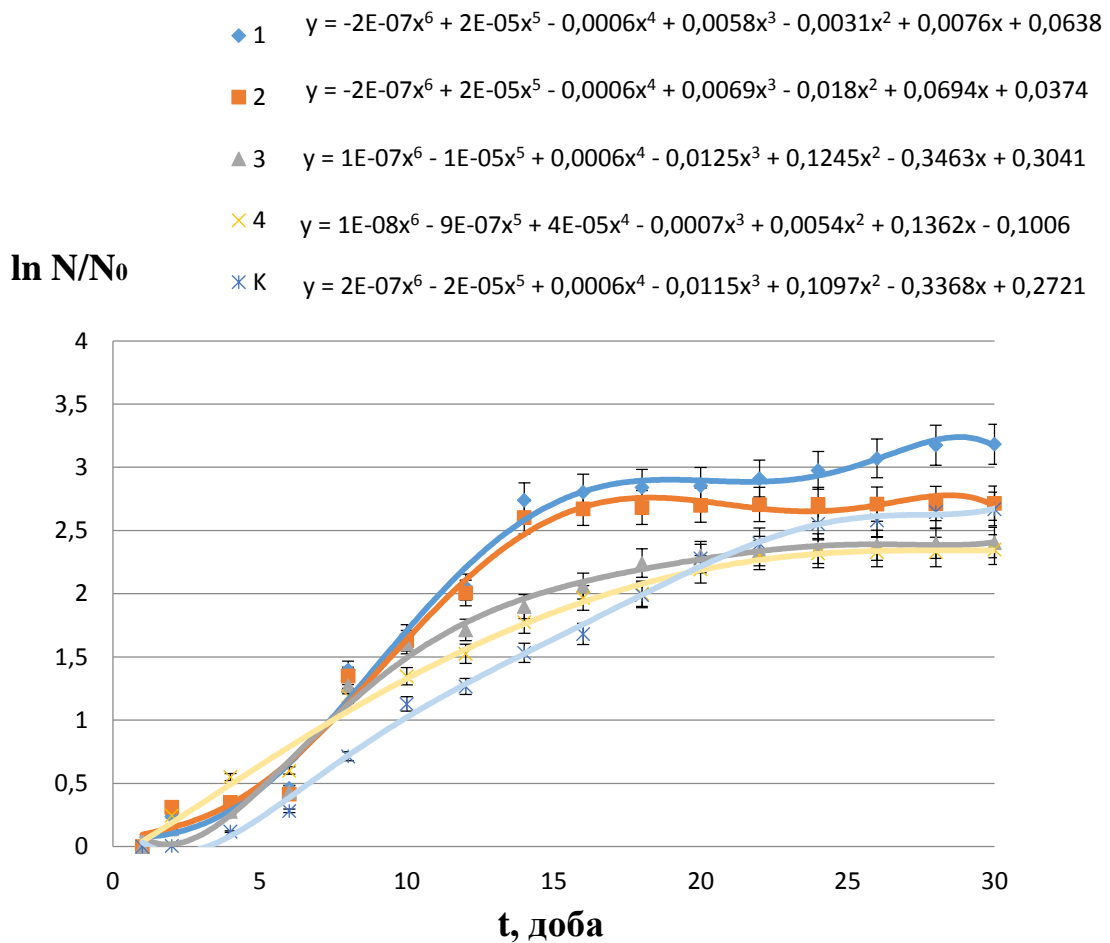


Рис. 5.4. Відносний приріст клітин *Chlorella vulgaris* ( $\ln N/N_0$ ) при культивуванні ( $t$ ) за різного складу середовища:

1 -  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 2 -  $\text{NH}_4\text{Cl}$  та  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  (1:1), 3 -  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ,  
4 - Громова № 6, К - Громова № 6 без ультразвукового опромінення,  $P \leq 0,05$ .

Питома швидкість приросту, розрахована за формулою (2.3) складає:  $\text{NH}_4\text{Cl}$   $-0,38$  доба $^{-1}$ ;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  та  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  (1:1)  $-0,35$  доба $^{-1}$ ;  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  -  $0,32$  доба $^{-1}$ ; Громова № 6 –  $0,28$  доба $^{-1}$ ; Громова № 6 без ультразвукового опромінення –  $0,23$  доба $^{-1}$ .

Час генерації, розрахований за формулою (2.4) складає:  $\text{NH}_4\text{Cl}$  - 1,8 доби;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  та  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  (1:1) - 1,98 доби;  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  - 2,16 доби; Громова № 6 - 2,48 доби; Громова №6 без ультразвукового опромінення - 3,01 доби.

На рис. 5.5 наведено вихід біомаси та ліпідів *Chlorella vulgaris* при одночасній дії ультразвукового опромінення та різних джерел нітрогену. Як

видно з рис. 5.5 на значення виходу біомаси більше впливає опромінення, ніж джерело нітрогену. Майже однаковий вихід характерний для суміші сечовини з амоній хлоридом та сечовини як джерела нітрогену. Не відповідність значень оптичної густини суспензії за використання сечовини, можливо пов'язано з утворенням колоній при підвищеному значенні рН.

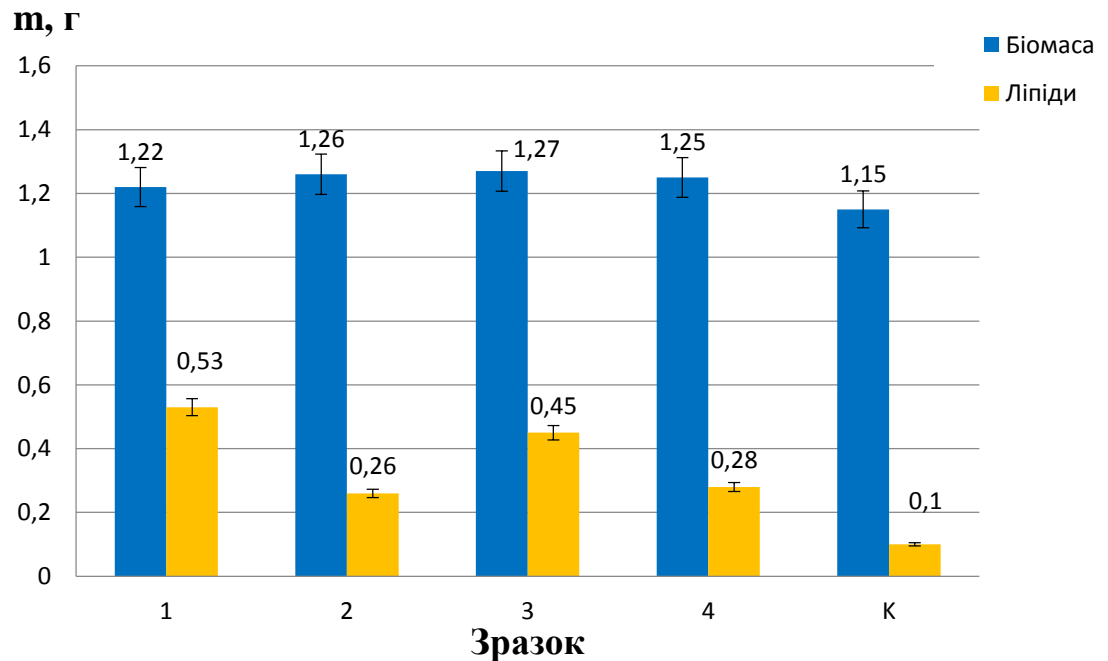


Рис. 5.5. Вихід біомаси та ліпідів (m) мікрowodоростей *Chlorella vulgaris* при опроміненні ультразвуком та різного джерела нітрогену в середовищі:

1 -  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 2 -  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ , 3 -  $\text{NH}_4\text{Cl}$  та  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  (1:1), 4 - Громова № 6, К - Громова № 6 без ультразвукового опромінення на 30 добу культивування,  $P \leq 0,05$ .

На біосинтез ліпідної фракції *Chlorella vulgaris* впливає як ультразвукове опромінення, так і джерело нітрогену. Найбільший питомий вміст ліпідної фракції спостерігається за використання  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (рис. 5.5, 5.6, поз. 1) і досягає 43,44% за виходу біомаси 1,22 г. Високий вміст ліпідної фракції пов'язаний з низькими значеннями рН середовища, що сприяє біосинтезу триацилгліцеролів [41]. За використання суміші (рис. 5.5, 5.6, поз. 3) рН знаходиться в слабо-лужному діапазоні значень. При цьому під час пропускання  $\text{CO}_2$  відбувається тимчасове зниження значення рН, що сприяє

біосинтезу ліпідів. В цьому випадку вихід ліпідної фракції нижчий, але приріст біомаси дещо вищий, що підвищує загальний вихід ліпідів. Найнижчий вихід ліпідної фракції характерний для середовища культивування, що містить тільки сечовину як джерело нітрогену. Також слід зауважити, що ми використовували метод Соксклета для визначення вмісту ліпідів. За цим методом одержуємо, в основному, триацилгліцероли, в той час як використання сечовини як джерела нітрогену сприяє біосинтезу поліненасичених жирних кислот, які не екстрагуються гексаном [52].

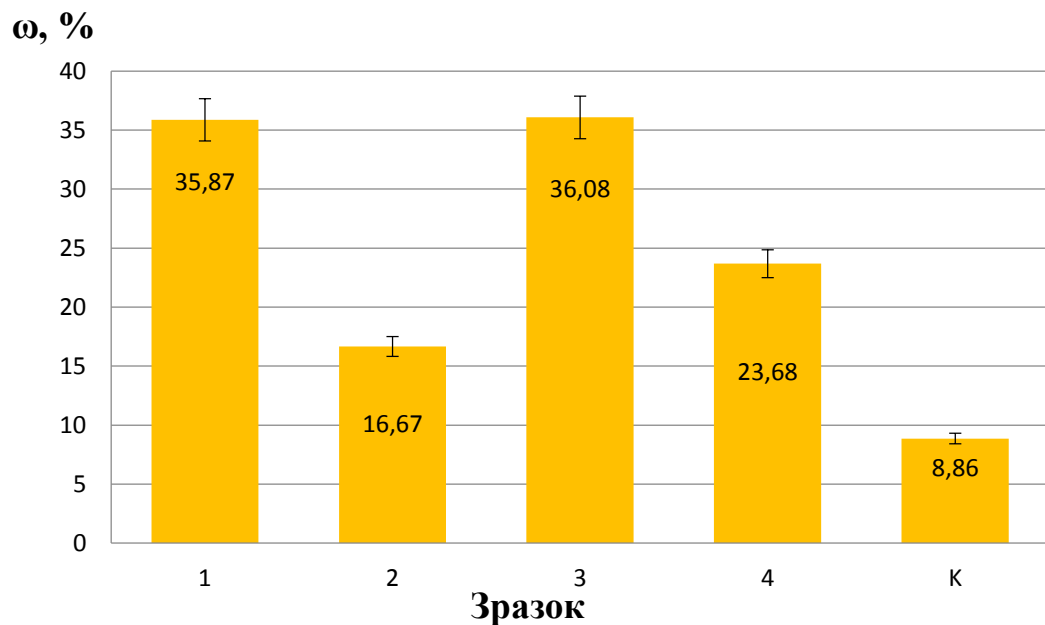


Рис. 5.6. Питомий вміст ліпідної фракції ( $\omega$ ) у *Chlorella vulgaris* в залежності від джерела нітрогену:

1 -  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 2 -  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ , 3 -  $\text{NH}_4\text{Cl}$  та  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  (1:1), 4 - Громова №6, К - Громова №6 без ультразвукового опромінення на 30 добу культивування,  $P \leq 0,05$ .

Виходячи з рис. 5.5 та 5.6 можна стверджувати, що ультразвукове опромінення сприяє біосинтезу ліпідів, в той час як речовини, що призводять до зміни рН середовища в лужну сторону під час культивування змінюють метаболізм клітин в бік, що призводить до зниження виходу ліпідної фракції. Найвищий вихід ліпідної фракції при одночасній дії ультразвукового опромінення та різних джерел нітрогену спостерігається за використання

амонійного азоту як джерела живлення. Так, використання тільки амонійного нітрогену призводить до збільшення виходу ліпідів у 2 рази по відношенню до нітратної форми та сечовини. За використання суміші іонів амонію та сечовини вихід ліпідів збільшується у 1,75 разів по відношенню до культивування мікроводоростей на середовищі з сечовиною, як джерелом нітрогену. Дія ультразвукового опромінення підвищує вихід ліпідів майже у три рази, про що свідчить вихід ліпідів з клітин мікроводоростей, які вирощені на середовищі Громова №6 з опроміненням та без нього.

Таким чином на приріст біомаси мікроводоростей при одночасному застосуванні опромінення ультразвуковою частотою у 20 кГц та різних форм нітрогену для живлення найбільший вплив на приріст біомаси має ультразвукове опромінення, про що свідчить майже однаковий приріст біомаси. В той же час на біосинтез триацилгліцеролів впливає як опромінення, так і джерело нітрогену. Найвищий вихід ліпідів характерний для культивування на середовищі з амонійним нітрогеном.

#### Висновки до розділу

1. Встановлено, що на приріст біомаси мікроводоростей *Chlorella vulgaris* впливає джерело нітрогену та зміна значення рН середовища. Найвищий приріст біомаси характерний для середовища з екстрактом посліду, що пов'язано з одночасним вмістом іонів амонію та сечовини, сталим значенням  $\text{pH} = 7 \pm 0,2$  та міксотрофними умовами культивування.

2. Показано, що зміна значень рН до  $5,5 \pm 0,3$  та  $8,4 \pm 0,3$  не впливає на швидкість приросту біомаси. Відхілення від даного діапазону призводить до зниження приросту біомаси та загибелі клітин мікроводоростей.

3. Вищий приріст біомаси характерний для джерел нітрогену, що не потребує значних витрат енергії для їх використання клітиною. Раціональним джерелом нітрогену для культивування мікроводоростей є іони амонію та сечовина. Нітрат іони потребують джерело енергії для їх перетворення в

амінну форму і призводять до залуговування середовища, що негативно впливає на приріст біомаси.

4. Встановлено, що за одночасного використання ультразвукового опромінення та різних форм нітрогену на приріст біомаси більший вплив має дія ультразвукових частот, ніж джерело нітрогену. За опромінення частотою 20 кГц приріст біомаси збільшується у 3 рази.

5. Експериментально визначено, що на питомий вміст триацилгліцеролів у клітинах *Chlorella vulgaris* впливає форма джерела нітрогену у середовищі культивування. Найбільший вміст ліпідів –  $43,4 \pm 0,5\%$  характерний для середовища з іонами амонію, як джерела нітрогену. Одержані результати є підґрунтям для створення технології культивування мікрободоростей з підвищеним вмістом ліпідів для отримання біодизельного палива.

За результатами досліджень, що наведені в розділі, опубліковано 2 статті: одна – іноземна [138], та у фаховому виданні, що входить до наукометричних баз даних [139].



## РОЗДІЛ 6

### ТЕХНОЛОГІЧНІ РІШЕННЯ ДЛЯ ОТРИМАННЯ БІОДИЗЕЛЬНОГО ПАЛИВА З МІКРОВОДОРОСТЕЙ

Відомо, що існуючи на сьогодні технології культивування мікроводоростей з метою одержання енергоносіїв є енерговитратними і не конкурентоздатними відносно технологій отримання пального з викопної сировини. Напрямами підвищення конкурентоздатності є:

- підвищення швидкості росту біомаси мікроводоростей;
- підвищення вмісту ліпідів у клітинах;
- одержання побічних корисних речовин, що дає змогу знизити собівартість культивування.

Для одержання біодизельного палива використовують генномодифіковані мікроводорості видів *Chloropsis* і *Nanochloropsis* з високим приростом біомаси та вмісту ліпідів, концентрація яких досягає 70% [142]. Такі штами відсутні в Україні. При цьому генномодифіковані штами збіднені на інші корисні речовини і, відповідно, одержання інших біологічно активних речовин з відпрацьованої біомаси неможливо.

Мікроводорості *Chlorella vulgaris* за вмістом різних корисних речовин перевищують інші види. При підвищенні вмісту ліпідів до 50% сухої біомаси їх можна використовувати як для отримання біодизельного палива, так і для одержання біологічно активних добавок, що дасть змогу знизити собівартість пального.

Метою дослідження було обґрунтування технологічних рішень підвищення швидкості росту *Chlorella vulgaris* з одночасним збільшенням вмісту ліпідів у клітинах. Для цього необхідно:

- визначити одночасний вплив ультразвукового опромінення, діапазонів довжин хвиль освітлення та джерела нітрогену на приріст біомаси мікроводоростей;

- обґрунтувати раціональні технологічні режими культивування *Chlorella vulgaris* для підвищення біосинтезу клітинами триацилгліцеролів;
- розробити технологічну та відповідну їй апаратурну схеми вирощування біомаси мікроводоростей та одержання з неї біодизельного палива.

### 6.1 Обґрунтування технології культивування мікроводоростей *Chlorella vulgaris*

Дія ультразвукового опромінення на клітини мікроводоростей дає змогу інтенсифікувати метаболічні процеси в клітинах, що призводить до підвищення темпів приросту біомаси та ліпідів. Сполуки нітрогену, як джерело живлення, мають різний вплив на метаболізм і дають змогу керувати біосинтетичними процесами утворення ліпідів різних класів – фосфоліпідів, ацилгліцеролів, насичених та ненасичених жирних кислот. Також на приріст біомаси та синтез різних класів вищих жирних кислот впливає довжина хвиль видимого спектра та їх співвідношення. При цьому стресові фактори, які мають однаковий вплив на клітини *Chlorella vulgaris*, при поєднанні можуть або підсилювати дію один одного, що буде сприяти вирішенню поставлених задач, або інгібувати біосинтетичні процеси та змінювати їх напрямок з біосинтезу триацилгліцеролів – сировини для отримання біодизельного палива, в бік утворення інших продуктів чи ліпідів з підвищеним вмістом ненасичених жирних кислот, кількість яких у паливі обмежена Європейським стандартом EN 14214, оскільки знижується його якість.

Культуру мікроводоростей вирощували за використання природного освітлення у світловий період з одночасним періодичним освітленням світлодіодами. В період темряви режим освітлення світлодіодами був 4 години світло 4 години темрява. Співвідношення червоних, зелених та синіх світлодіодів 2:1:1, відповідно. Вибір діапазону хвиль світлодіодів та їх співвідношення ґрунтувалось на дослідженнях, описаних в розділі 4.

Ультразвукове опромінення частотою 20 кГц проводили 1 раз на добу протягом 1 хвилини. Частота опромінення вибрана у відповідності до досліджень, які представлені у розділі 3. Як джерело нітрогену використовували хлорид амонію, сечовину та їх суміш у різному співвідношенні.

На рис. 6.1 наведено зміну приросту біомаси *Chlorella vulgaris* за 20 діб культивування в залежності від джерела нітрогену при одночасному ультразвуковому опроміненні та освітленні світлодіодами, температура –  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ .

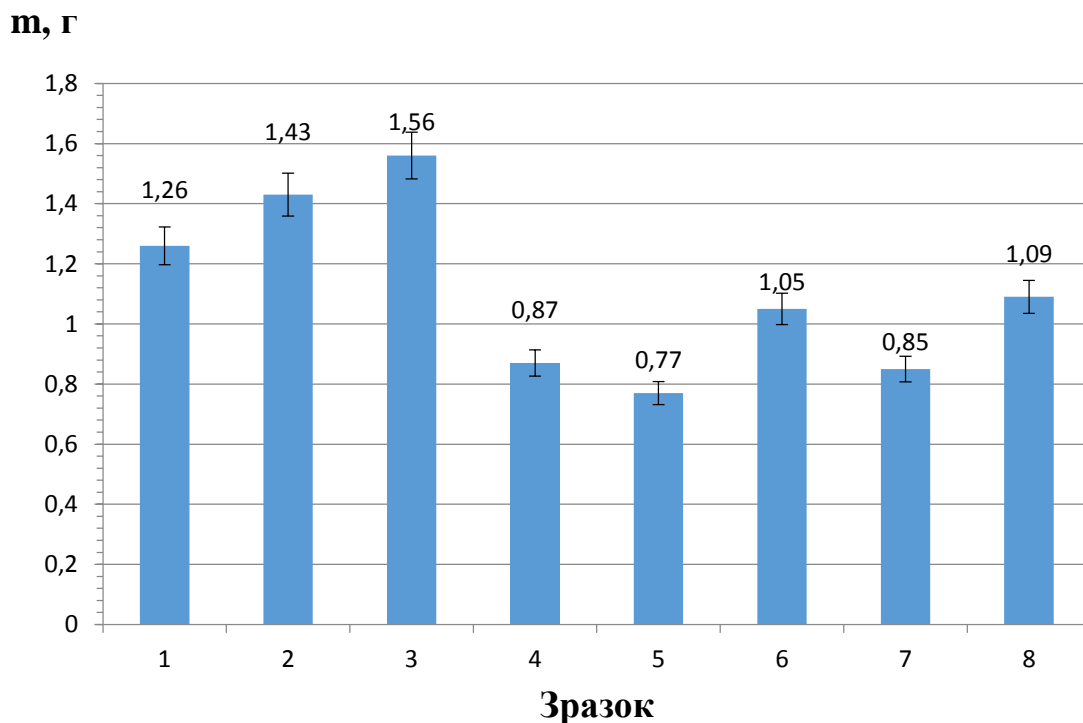


Рис. 6.1. Зміна приросту біомаси *Chlorella vulgaris* (m) в залежності від комбінації світлодіодів та джерела нітрогену: червоні/сині/зелені (2:1:1) - 1 -  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 2 -  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ , співвідношення  $((\text{NH}_4\text{Cl}):\text{CO}(\text{NH}_2)_2)$ : 3 - 1:1, 4 - 3:7, 5 - 7:3, червоні/сині/зелені (1:1:1) - співвідношення  $((\text{NH}_4\text{Cl}):\text{CO}(\text{NH}_2)_2)$ : 6 - 1:1, 7 - 3:7, 8 - 7:3,  $P \leq 0,05$ .

Як видно з рис. 6.1 найвищий приріст біомаси *Chlorella vulgaris* спостерігається за використання середовища з еквімолярним за нітрогеном

співвідношенням суміші хлориду амонію та сечовини при опроміненні світлодіодами у комбінації червоні/сині/зелені (2:1:1). Інше співвідношення джерел нітрогену призводить до значного зниження приросту біомаси (на 0,46% для співвідношення 3:7 та 50% для співвідношення 7:3) по відношенню до середовища з співвідношенням 1:1. Також використання одної з форм нітрогену – або амонію, або сечовини збільшує приріст біомаси по відношенню до нееквімолярних концентрацій нітрогену за використання різних сполук. При чому приріст біомаси за використання сечовини на 11% більше, ніж за використання іонів амонію.

За використання комбінації світлодіодів червоний/синій/зелений у співвідношенні (1:1:1) відбувається зменшення приросту біомаси на 33% при використанні еквімолярної суміші джерел нітрогену. За використання співвідношення іонів амонію та сечовини 3:7 приріст біомаси не змінюється, при співвідношенні 7:3, відповідно, приріст збільшується на 30% і перевищує приріст біомаси в межах похибки при застосуванні співвідношення 1:1. Тобто, для використання в технології різних комбінацій та джерел нітрогену для досягнення найбільшого приросту біомаси необхідно встановлювати свою комбінацію довжин хвиль світлодіодів та їх співвідношення.

Як було показано в інших главах, підвищення швидкості приросту біомаси не завжди відповідає збільшенню біосинтезу клітинами необхідного продукту (в нашому випадку ліпідів), на вихід якого впливають як джерела живлення та і фізичні параметри культивування – комбінації хвиль освітлення, частота опромінення тощо.

На рис. 6.2 наведено питомий вміст ліпідної фракції у біомасі при культивуванні мікроводоростей за використання різних джерел нітрогену, освітленні світлодіодами та опроміненні ультразвуком. Одночасний вплив на процес культивування джерела нітрогену, режиму освітлення та опромінення ультразвуком дає змогу змінити метаболізм клітин *Chlorella vulgaris*.

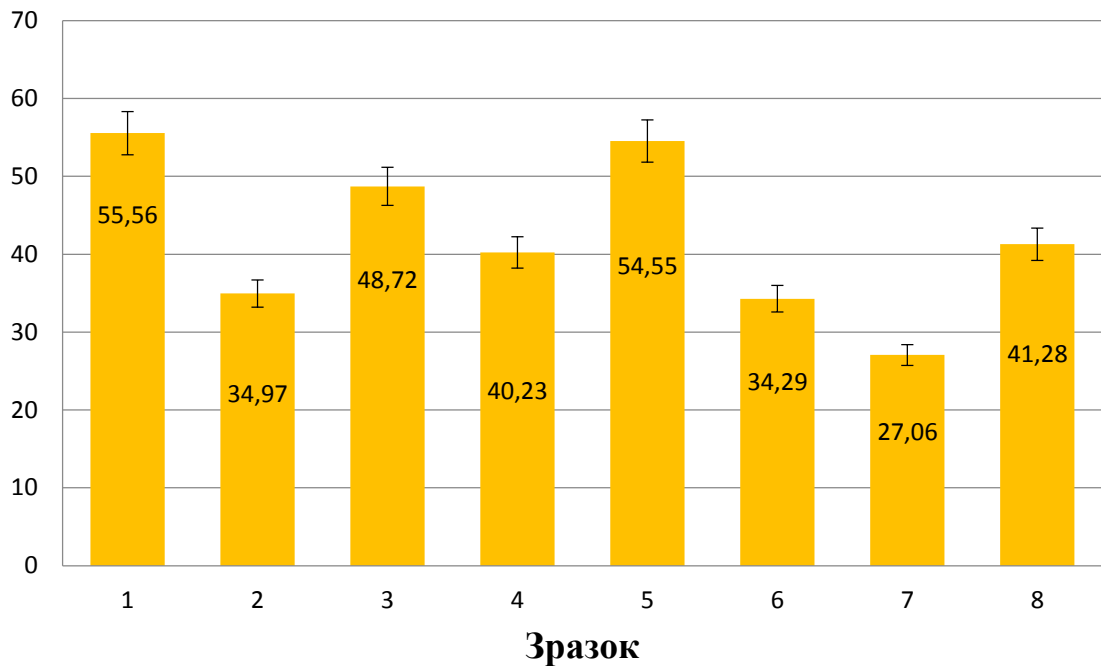
$\omega$ , %

Рис.6.2. Питомий вміст ліпідів ( $\omega$ ) у клітинах *Chlorella vulgaris* в залежності від комбінації світлодіодів та джерела нітрогену: червоні/сині/зелені (2:1:1) - 1 -  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 2 -  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ , співвідношення  $((\text{NH}_4\text{Cl}):\text{CO}(\text{NH}_2)_2)$ : 3 - 1:1, 4 - 3:7, 5 - 7:3, червоні/сині/зелені (1:1:1) - співвідношення  $((\text{NH}_4\text{Cl}):\text{CO}(\text{NH}_2)_2)$ : 6 - 1:1, 7 - 3:7, 8 - 7:3,  $P \leq 0,05$ .

Як видно з рис.6.2 на біосинтез триацилгліцеролів впливає як режим освітлення, так і джерело нітрогену. Найбільший приріст біомаси, що характерний для культурального середовища з сумішшю сечовини та хлориду амонію, та сечовиною (рис. 6.1), не дає вищого виходу ліпідів. Збільшення продукування ліпідів характерно для середовища з вищим вмістом іонів амонію (поз.1, 5, 8 рис. 6.2). В той же час на вихід ліпідної фракції впливає співвідношення частот світлодіодів. При підвищенні інтенсивності червоного спектру опромінення збільшується не тільки приріст біомаси, а і концентрація ліпідної фракції у 1,3 – 1,5 разів в залежності від співвідношення джерел нітрогену (поз. 3, 4, 5, рис. 6.2). За використання іонів амонію як єдиного джерела нітрогену вміст ліпідів в клітинах перевищує на 11% їх вміст при

культивуванні на еквімолярній за нітрогеном суміші іонів амонію та сечовини. Проте, за використання суміші внаслідок інтенсифікації процесу росту кількість ліпідів за термін вирощування однакова.

Однчасна дія на клітини мікрободоростей фізичних факторів впливає на якісний вміст жирних кислот у ліпідах, культивування проводилося за використання середовища Громова № 6 (табл.6.1). Так, дія опромінення з червоними, синіми та зеленими довжинами хвиль (1:1:1) та ультразвуку підвищує біосинтез насичених жирних кислот, особливо C13, C16 та C18, в той час як дія тільки освітлення з зазначеними довжинами хвиль призводить до збільшення ненасичених жирних кислот – олеїнової, лінолевої та ліноленової (табл. 6.1) по відношенню до сумісної дії факторів.

Таблиця 6.1

**Склад жирних кислот у ліпідах мікрободоростей *Chlorella vulgaris* при дії ультразвукового опромінення та освітлення світлодіодами**

№пп	Кислота	Вміст к-т за сумісної дії фізичних факторів, %	Вміст к-т при освітленні світло діодами, %	Вміст к-т при природному освітленні, % [143, 144]	Вміст к-т в олії з ріпаку [145]
1	Тридеканова	27,76 ± 1,38	22,22 ± 1,11	16,6 ± 0,83	-
2	Пальмітинова	40,04 ± 2,02	38,83 ± 1,94	37,2 ± 1,86	5 ± 0,25
3	Гептадеценнова	2,64 ± 0,13	1,77 ± 0,02	4,9 ± 0,25	-
4	Стеаринова	20,11 ± 1	18,85 ± 0,94	11,57 ± 0,58	7,8 ± 0,39
5	Олеїнова	3,64 ± 0,18	8,97 ± 0,45	17,25 ± 0,86	57,9 ± 2,9
6	Лінолева	3,94 ± 0,2	6,07 ± 0,3	11,97 ± 0,6	21 ± 1,05
7	Ліноленова	1,87 ± 0,09	3,28 ± 0,16	0,51 ± 0,02	10,3 ± 0,52

Також змінюється вміст жирних кислот за застосування світлодіодів по відношенню до природнього освітлення. Використання червоного, синього та зеленого діапазонів довжин хвиль зміщує біосинтез в бік насичених жирних кислот, значно зменшуючи долю ненасичених жирних кислот (олеїнової) (табл.6.1). Такий склад жирних кислот дасть змогу отримати біодизельне паливо, що відповідає Європейському стандарту, без застосування додаткових стадій його гідрогенізації, як це необхідно проводити для біодизельного палива, що отримують з ріпакової олії (табл. 6.1).

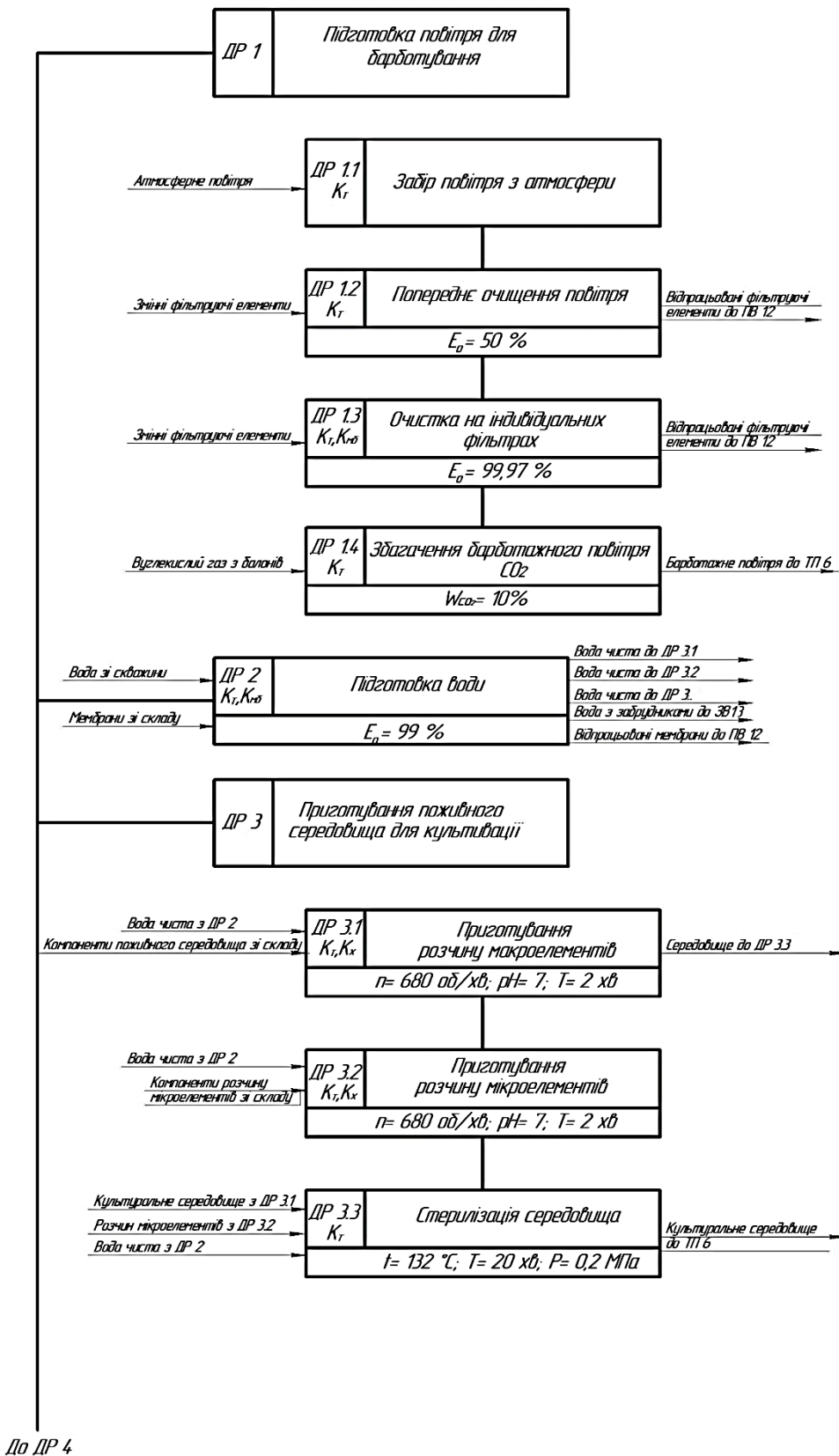
Таким чином, одночасний вплив фізичних та хімічних факторів на культивування *Chlorella vulgaris* дає змогу змінювати метаболізм клітин і підвищити вихід біомаси та ліпідів. Виходячи з одержаних експериментальних даних, раціональними параметрами для культивування мікроводоростей *Chlorella vulgaris* з метою одержання підвищеного вмісту ліпідної фракції є: температура середовища  $30 \pm 2$  °С, одночасне використання природного та штучного освітлення комбінацією світлодіодів червоні/сині/зелені у співвідношенні (2:1:1), опромінення ультразвуком частотою 20 кГц. На основі одержаних результатів пропонується біотехнологія культивування мікроводоростей та отримання з них енергоносіїв.

## 6.2 Технологічний процес одержання енергоносіїв з мікроводоростей *Chlorella vulgaris*

Україна не має достатньої кількості мінеральної паливної сировини для забезпечення потреб виробництва та побуту. Розробка технологій одержання екологічно чистого палива з власної сировини дасть змогу стати незалежною державою від імпортованих енергоносіїв. Використання мікроводоростей для досягнення цієї мети дасть змогу вирішити як енергетичні, так і екологічні проблеми. Одночасно можна одержати сировинні ресурси для виготовлення кормових добавок, лікарських препаратів, або використати відходи для отримання біогазу та добрива.

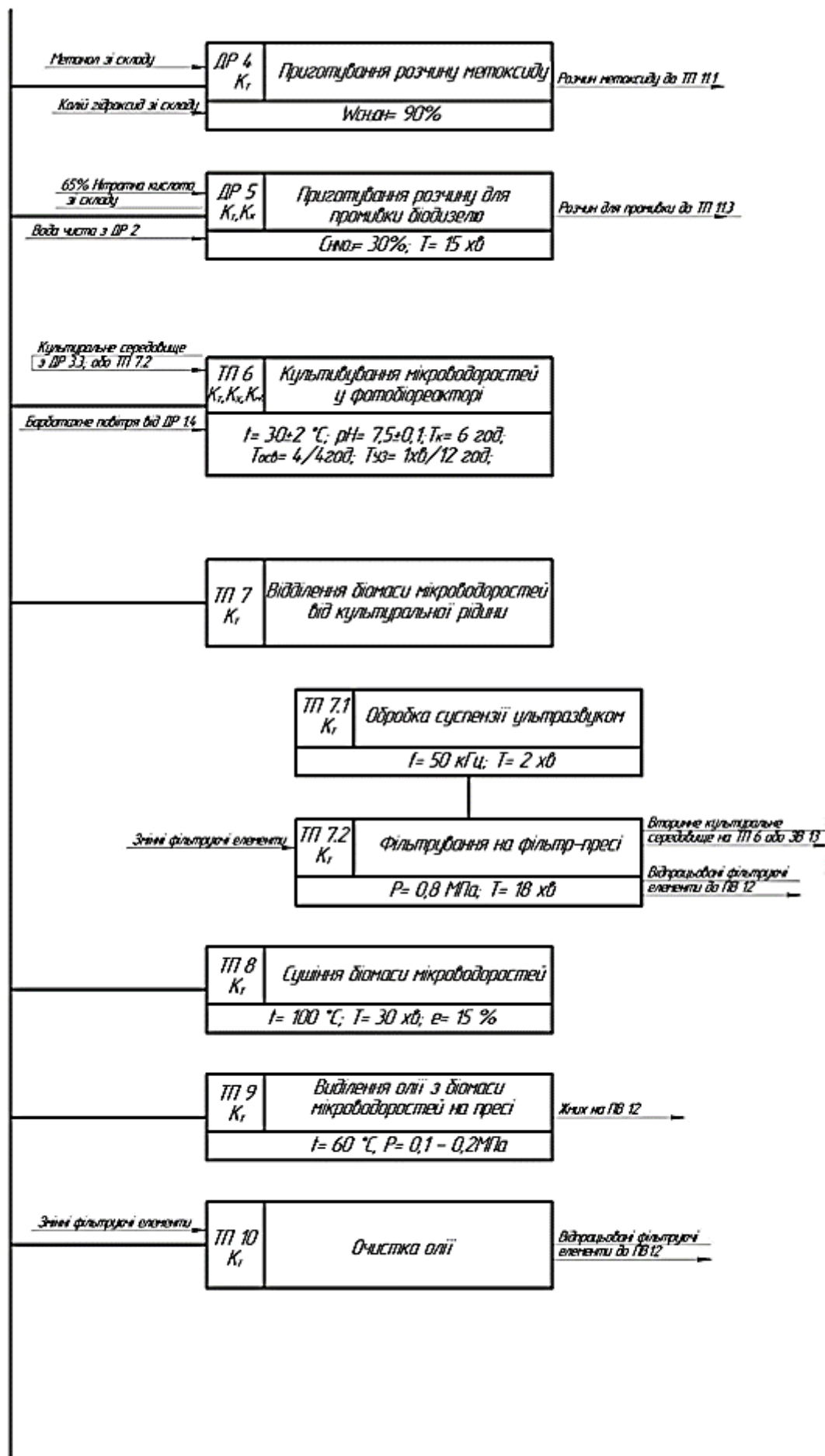
Україна нарощує виробництво сільськогосподарської продукції, особливо птахівництва. Мікроводорості *Chlorella vulgaris*, які містять у своєму складі комплекс вітамінів, факторів росту, мікроелементи та біологічно активні речовини можуть слугувати добавкою до кормів, що підвищує приріст біомаси, виробництво яєць, стійкість до захворювань та виживаність птахів [146]. Таким чином, на основі культивування *Chlorella vulgaris* можна створити безвідходне виробництво пального.

На рис.6.3 та 6.4 наведено технологічну та відповідну їй апаратурну схеми, в якій поєднано процеси культивування мікрободоростей з підвищеним вмістом ліпідів та одержання з них біодизельного палива.





Від ДР 3.3



Після ТП 11

Від ТП 10

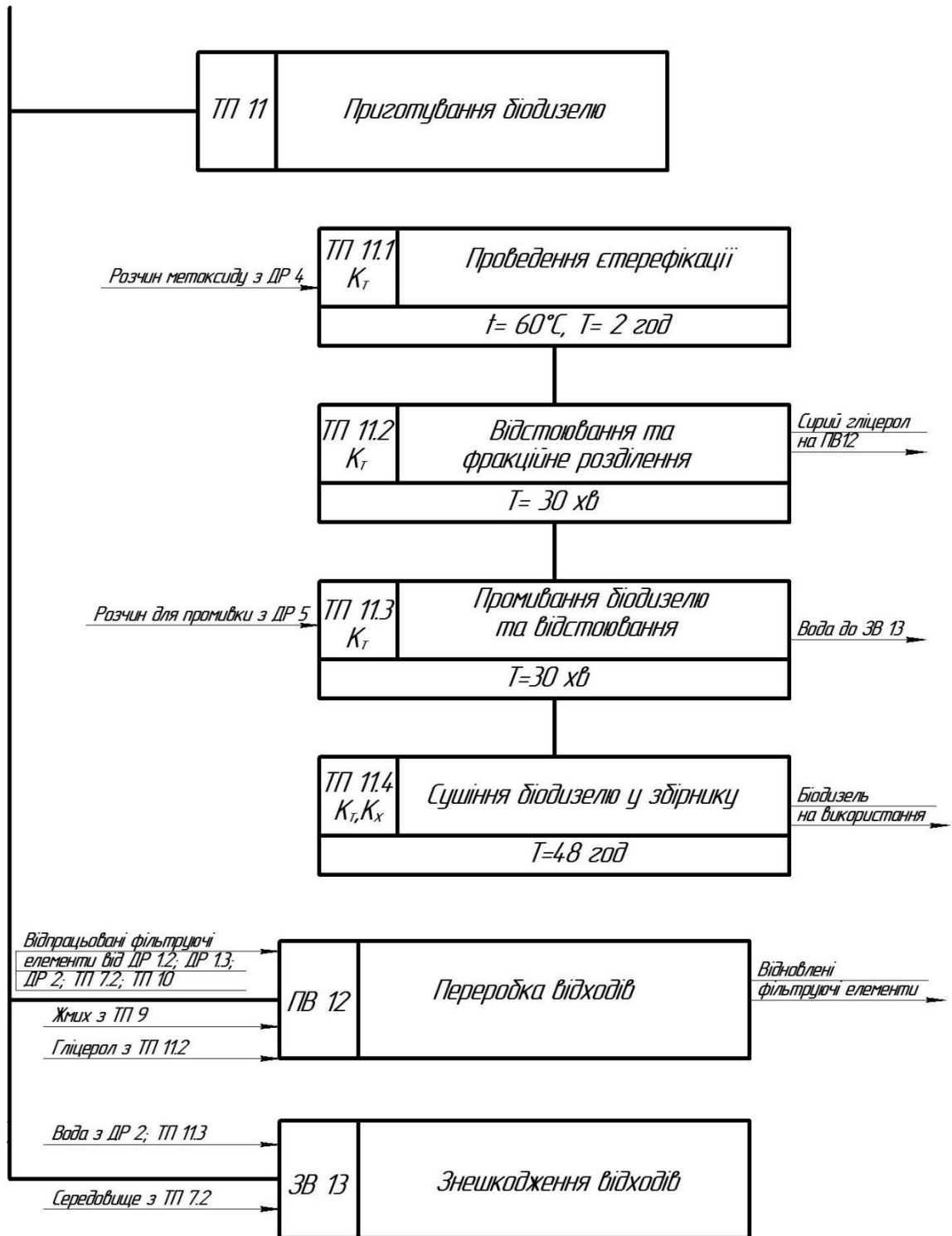


Рис. 6.3 Технологічна схема культивування мікробіодизельного палива та одержання біодизельного палива.

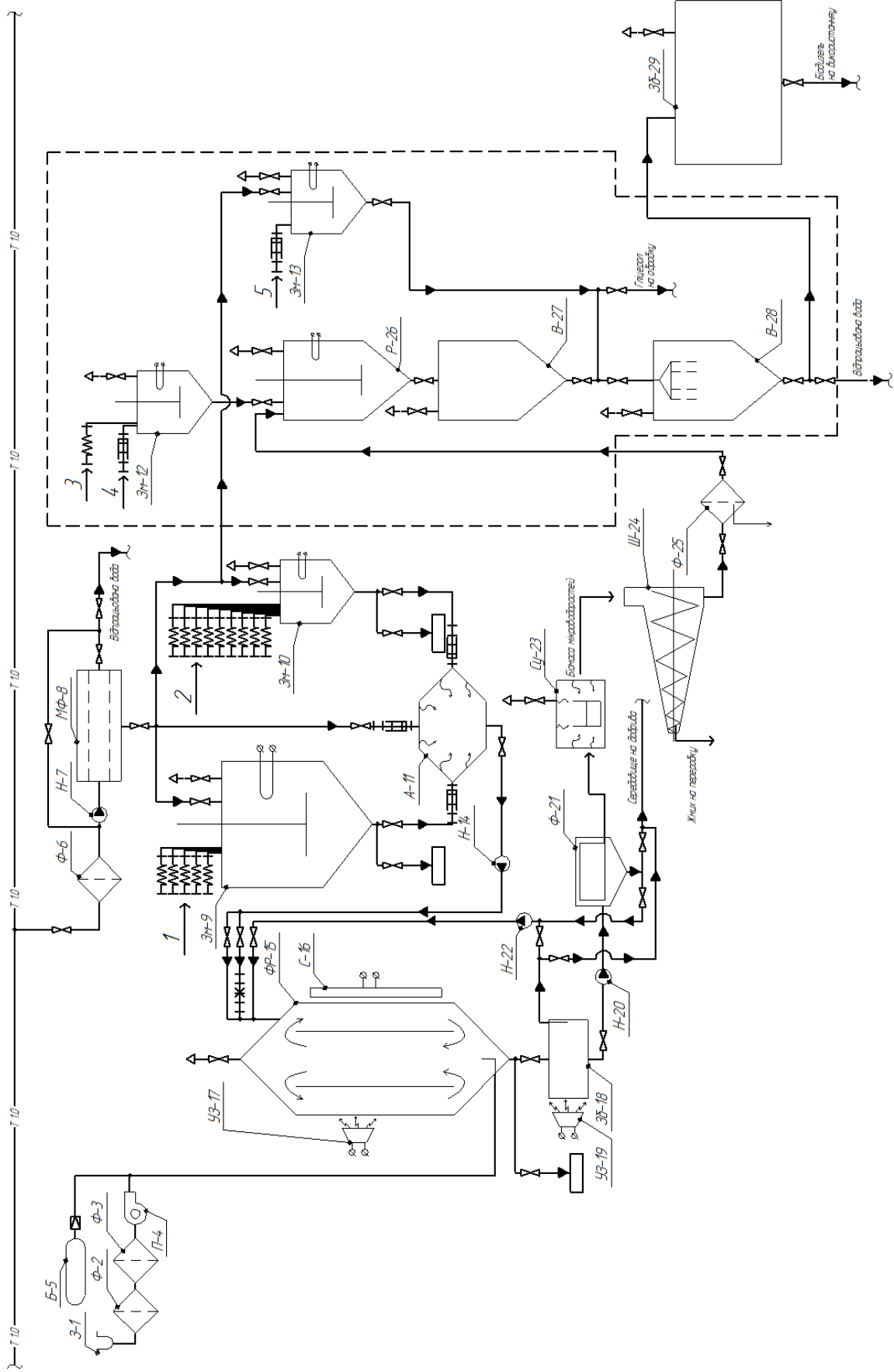


Рис. 6.4 Апаратурна схема культивування міководоростей та одержання біодизельного палива.

## ДР 1. Підготовка повітря для барботування

Для забезпечення клітин мікроводоростей рівномірним освітленням та рівномірного розподілу живильних речовин у фотореакторі необхідно застосовувати систему перемішування. За використання трубчатих фотореакторів найчастіше здійснюють перекачування суспензії мікроводоростей з високою швидкістю. Енергетично менш затратним способом є система ерліфту, для чого у фотореактор подається барботаже повітря, яке попередньо очищається для запобігання контамінації середовища іншими видами мікроорганізмів та інгібіторами росту клітин (рис. 6.3, ДР 1.2, ДР 1.3).

Забір атмосферного повітря здійснюється за допомогою виносних труб з точкою забору 4 – 6 м вище рівня землі при температурах від  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  до  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  (рис. 6.3, ДР1.1). Повітря пропускають крізь волокнисту касету типу G4 з фільтром Канал-ФКП, Україна, (рис.6.4, Ф-2), що затримує пил і частинки. Фільтрувальним матеріалом є тканина з діаметром пор 18 мкм. Ефективність очищення 50%. Ретельне очищення повітря відбувається за допомогою фільтра НЕРА (рис. 6.3, ДР 1.3, рис. 6.4, Ф-3), ефективність якого 99,97%, який встановлено у фільтр Канал-ФКП типу F5-8. Фільтр дозволяє проводити очищення від часток діаметром до 0,3 мікрон.

Для запобігання швидкого закиснення середовища при введенні джерела карбону –  $\text{CO}_2$ , і рівномірного його розподілу по об'єму реактора пропонується джерело живлення подавати періодично разом з барботажем повітрям (10 ÷ 15%  $\text{CO}_2$ ) [147]. На стадію ТП 6 (рис. 6.3) барботаже повітря подається за допомогою повітродувки RB-DV, Україна, (рис. 6.4 П-4). Продуктивність від 840 до 10500 м<sup>3</sup>/год. Головна особливість такого приладу полягає у відсутності забруднення середовища часточками мастильних матеріалів. Джерелом неорганічного карбону можуть слугувати газові викиди підприємств, за умови розташування фотореакторів біля виробництва, сміттєзвалищ, з яких видобувають біогаз, або ТЕЦ.

Також повітря можна використовувувати для створення раціонального температурного режиму культивування. Оскільки раціональною температурою є  $30 \pm 2$  °С, обігрів реактора можна проводити підігрітим повітрям. В нашому випадку пропонується використання для підігріву світлодіодів (рис. 6.4, С-16).

#### ДР 2. Підготовка води

В залежності від місця знаходження виробництва якість води в системах водопостачання може відрізнятися за вмістом неорганічних та органічних речовин, жорсткістю, солоністю, складом мікроорганізмів тощо. Вміст карбонатів та фосфатів може призвести до осадження в культуральному середовищі живильних елементів таких як ферум, купрум, молібден тощо, що буде впливати на швидкість росту культури. Тому пропонується використовувати артезіанські свердловини глибиною більше 90 м. Для очищення води пропонується установка зворотного осмосу ООС-45.0 (Росія) (рис. 6.4, Ф-6, Н-7, МФ-8). За її використання видаляються органічні та неорганічні забрудники, мікроорганізми та солі  $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ ,  $\text{Mg}(\text{HCO}_3)_2$ ,  $\text{CaSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$  і  $\text{MgCl}_2$ , що обумовлюють жорсткість води. Продуктивність 45 м<sup>3</sup>/год, потужність до 34 кВт.

#### ДР 3. Підготовка поживного середовища

При вирощуванні мікроводоростей необхідно вводити у фотореактор живильні речовини у кількості, що забезпечує необхідний приріст біомаси. При цьому концентрація солей не повинна перевищувати раціональну, оскільки як надлишок, так і нестача негативно впливають на приріст біомаси та можуть змінювати метаболізм клітин. Як поживне середовище для культивування мікроводоростей пропонується використовувати модифіковане за нітрогеном середовище Громова №6. Окрім основних солей середовище містить мікроелементи, які додаються у співвідношенні розчинів 1000:1, відповідно. Основні солі:  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{CO}(\text{NH}_4)_2$  у співвідношенні за нітрогеном 1:1;  $\text{KCl}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{CaCl}_2$ ;  $\text{NaHCO}_3$ ; мікроелементи:  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;

MnSO<sub>4</sub>; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O; NaBO<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; CaCl<sub>2</sub>; Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; ЕДТА.

Доступність живильних елементів залежить від рН середовища, оскільки при підвищенні рН фосфати Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> випадають в осад і, відповідно, порушується процес культивування. Тому необхідно підтримувати значення рН в діапазоні 6,7 ± 0,3.

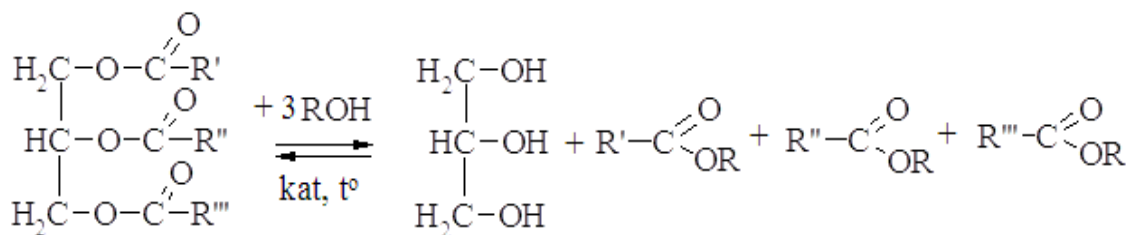
Розчини мікроелементів та основних компонентів поживного середовища готуються в різних ємностях при інтенсивному перемішуванні (рис. 6.3, ДР 3.1, ДР 3.2, рис. 6.4, Зм-9, Зм-10). Перемішування здійснюється за допомогою турбінних мішалок серії VMP 680, Україна. Потужність мішалки - 1 кВт, частота обертів - 680 об/хв. Змішувачі обладнані шнековими дозаторами ДШ2-1, Україна, для кожного компонента (рис. 6.4, 1 - для основних компонентів середовища 5 штук; 2 - для розчину мікроелементів 9 штук). Для запобігання утворення осаду солі вносять до розчину у послідовності згідно пропису.

Для запобігання контамінації культурального середовища іншими видами мікроорганізмів перед подачею його до фотореактора на ТП 6 проводять процес стерилізації (рис. 6.3, ДР 3.3) протягом 20 хвилин, тиск - 0,2 МПа, при температурі - 132°C. В автоклав ВК-75-01 або виготовлений на замовлення, Україна, потужність 8 кВт (рис. 6.4, А-11) послідовно додають основне середовище та розчин мікроелементів і доводять водою з ДР 2 до необхідного об'єма. Процес стерилізації стандартного середовища необхідний для запуску процесу вирощування мікроводоростей *Chlorella vulgaris*. У разі використання витяжки з посліду як поживного середовища стадія стерилізація є необхідною.

#### ДР 4. Приготування розчину метоксиду

Як біодизельне паливо використовують естери жирних кислот. Для їх одержання проводять реакцію переестерифікації триацилгліцеролів за

реакцією:



Найбільш розповсюдженою в Україні та світі є технологія з використанням метанолу та гідроксиду натрію як каталізатора. Для підвищення виходу естерів метанол необхідно брати у надлишку (на 5% більше від стехіометричного розрахунку), каталізатор - 10% від маси метанолу. Для виготовлення 1 т біодизельного палива необхідно 111 кг метанолу та 12 кг лугу.

Метанол подається через рідинний насос - дозатор у змішувач ТЕК-2БМ (рис.6.4, Зм-12), який обладнано турбінною мішалкою, потужність 1 кВт, частота обертів - 690 об/хв. До метанолу з дозатора ДШ2-1, Україна, додається NaOH. Змішування речовин відбувається протягом 15 хв. до досягнення гомогенного розчину.

#### ДР 5. Приготування розчину для промивки біодизелю

Біодизельна фракція містить залишки метанолу, мила, гліцеролу, лугу та води, які впливають на якість біодизельного палива. Для її очищення від домішок використовують 10% розчин нітратної кислоти. Розчин готують шляхом розведення концентрованої кислоти. У змішувач Зм -13 (рис.6.4) до води, яку подають зі стадії ДР 2, через об'ємний дозатор вносять визначену кількість 65% азотної кислоти при інтенсивному перемішуванні. Перемішувач - VPN 680 (Україна).

#### ТП 6. Культивування мікроводоростей у фотобіореакторі

Нарощування біомаси мікроводоростей *Chlorella vulgaris* пропонується проводити у фотобіореакторах колонного типу з системою ерліфту для перемішування культурального середовища. Барботажне повітря подається з

ДР 3.4. через інжектор знизу реактора. Швидкість подачі барботажного повітря 10 дм<sup>3</sup>/хв.

Дно фотобіореактора обладнано клапаном зливу суспензії мікроводоростей. Кришка містить отвори для відбору проб та внесення поживного середовища, клапан для виведення барботажного повітря. Подача культурального середовища здійснюється за допомогою насоса-дозатора MXE CD/DL-05, Італія, з швидкістю пропускання 0,5 дм<sup>3</sup>/хв.

У процесі культивування контролюється: температура, рН, густина суспензії (система оптичного аналізу AlgaeTorch, Німеччина), рівень культурального середовища (рівнемір MXE CD/DL, Італія).

Для запобігання обростання мікроводоростями стінок фотобіореактора, що призводить до зниження надходження світлової енергії до клітин, і, відповідно, до зниження приросту біомаси, реактор обладнано системою очищення власної конструкції. Тороїдальний шкребок вкритий м'якою тканиною містить магніти, які розташовані під кутами 30 – 45 °, чергуючись з протилежно направленими магнітами ззовні корпусу, прикріпленими до кільця. Така конструкція дає змогу управляти шкребком.

Як показали дослідження [148], приріст біомаси та вміст ліпідів у клітинах підвищується за використання періодичного надходження CO<sub>2</sub>. З балону Б-5 (рис. 6.4) оксид карбону (IV) через редуктор У-30 П 36V, Україна, (потужність 200 Вт, пропускна здатність 40 дм<sup>3</sup>/хв.) кожні 4 год. надходить до барботажного повітря. Швидкість потоку встановлюється для забезпечення 10% концентрації CO<sub>2</sub> у барботажній суміші. Тривалість барботування CO<sub>2</sub> має гіперболічну залежність і визначається швидкістю приросту біомаси з розрахунку вмісту карбону у клітинах 50%. При цьому на кількість та швидкість подачі CO<sub>2</sub> впливає значення рН середовища.

Температурний режим у фотобіореакторі підтримується за рахунок нагріву світлодіодних ламп (рис. 6.4, С-16). Температура регулюється за допомогою датчика температури і системи контролю з декількома каналами управління. За розташування фотобіореакторів у закритому приміщенні



можливо створювати необхідний температурний режим повітря у закритому просторі.

Для інтенсифікації процесу культивування, збільшення накопичення насичених триацилгліцеридів фотобіореактор обладнаний ультразвуковими випромінювачами УЗ-17 (рис. 6.4). Періодично (через 12 – 24 год.) протягом 1 хв. культуру опромінюють ультразвуком частотою 20 кГц. Тривалість ультразвукового опромінення та його періодичність регулюється за допомогою реле часу. Частота встановлюється генератором прямокутних функцій, що живиться від напруги 220 В, і здатний контролювати 8 пьезоелементів. Фотобіореактор обладнаний генераторами і випромінювачами, потужність одного генератора 12 Вт [149].

Освітлення культури здійснюється сонячним світлом у світловий період та штучно - світлодіодними світильниками в період темряви та сезонності. Освітлення світлодіодами здійснюється періодично 4 год. світло 4 год. темрява. Світлодіоди встановлюють згідно розробленої схеми для максимально рівномірного освітлення культури. За результатами досліджень, наведеними в розділі 4, для розвитку клітин мікроводоростей *Chlorella vulgaris* необхідно освітлення довжинами хвиль 450 та 675 для хлорофілу *a* та 475 та 625 нм для хлорофілу *b*, та 520 – 555 нм для каротиноїдів. Співвідношення світлодіодів у блоці 2:1:1, відповідно, 2 червоних (640 – 700 нм), 1 синій (450 – 480 нм), 1 зелений (520 – 555 нм). Тривалість освітлення та його періодичність регулюється за допомогою реле часу.

#### ТП 7. Відділення біомаси мікроводоростей від культуральної рідини

Відділення біомаси від культуральної рідини проводиться в два етапи. За допомогою насосу ВКС 5/24А-2Г, (Росія) (рис. 6.4, Н-20) суспензія водоростей подається у збірник Зб-18 (рис. 6.4, рис. 6.3, ТП 7.1), де обробляється ультразвуковим опроміненням частотою 50 кГц протягом 2 хв. (рис. 6.4, УЗ-19). Опромінення ультразвуком сприяє загибелі клітин та пришвидшує їх осадження. Надосадова рідина або використовується як рідина для поживного середовища (до 10 – 20 разів), або як добриво, або для

отримання біометану. Осад подається насосом на фільтр прес Hbrasol 200, (400), США, (рис. 6.4, Ф-21, рис. 6.3, ТП 7.2). Площа фільтрації 1 пластини 400 см<sup>2</sup>, кількість пластин варіює від 20 до 80 загальною площею від 3 до 12,5 м<sup>2</sup>, робочий тиск до 8 бар, продуктивність 7 м<sup>3</sup>/хв.

#### ТП 8. Сушіння біомаси мікроводоростей

Оскільки клітини мікроводоростей містять 90% і більше води, для одержання олії пресуванням необхідно довести вміст вологи до 10%. Після фільтрації біомаса у вигляді спресованих пластин транспортується за допомогою піддонів до сушарки С-100 СБКРР (СКР-8, 5) (рис. 6.4, Су-23). Температура висушування 110 ± 5 °С.

#### ТП 9. Виділення олії з біомаси мікроводоростей на пресі

Одержана суха біомаса за допомогою шнекового транспортера подається у прес екструдер Ш-24 (рис. 6.4). За допомогою низькотемпературного шнекового пресу ММШ-60, Україна, з біомаси мікроводоростей вилучають олію, температура олії на виході не перевищує 60° С, що запобігає окисненню. Продуктивність одного пресу 60 кг/год, потужність 7,5 кВт. Прес має вмонтований збірник олії.

#### ТП 10. Очистка олії

Очищення олії здійснюється за допомогою фільтру Ф-25, що входить до складу шнекового пресу Ш-24. За необхідності з метою освітлення олії можливо додавання освітлюючих адсорбентів під час фільтрування олії.

#### ТП 11. Приготування біодизелю

Приготування біодизелю здійснюється за технологією з використанням метанолу та гідроксиду натрію. Установа «ТЕКМАШ», Україна, містить всі апарати, які необхідні для проведення всіх стадій синтезу та очищення біодизельного палива. Виробнича продуктивність установки складає 500 дм<sup>3</sup>/год, потужність 11 кВт.

##### ТП 11.1. Проведення естерифікації

Олія надходить до реактора з рециркуляцією ТЕК-2БД (рис. 6.4, Р-26) за допомогою вмонтованого насоса, де відбувається нагрівання та

перемішування олії з розчином метоксиду, який надходить з ДР-4. Спирт та каталізатор попередньо змішуються у змішувачі ТЕК-2БМ (рис. 6.4, Зм-12), в який вони поступають зі збірників на установці. Реакція проводиться протягом 1 – 2 год.

#### ТП 11.2. Відстоювання та фракційне розділення

Після проведення естерифікації суміш поступає у ємності для відстоювання В-27 (рис. 6.4), що є частиною установки «ТЕКМАШ». Відстоювання проводять протягом 30 хв., після чого гліцеролову фракцію зливають і відправляють на інше виробництво.

#### ТП 11.3, 11.4. Промивання біодизелю водою та відстоювання

Біодизель відділений від гліцеролу поступає у другий осаджувач В-28 (рис. 6.4), оснащений душем для подачі підкисленої води для промивання біодизелю. Після відстоювання протягом 30 хв. відпрацьовану воду відправляють на знешкодження, біодизель зливають у збірник Зб-29 (рис. 6.4, рис. 6.3 ТП 11.4), де відбувається відстоювання протягом 48 год. За цей період залишки води, яку не вдалося видалити під час попередньої технологічної операції відстоювання, опускаються на дно ємності. Відбувається процес "сушки" біодизелю. Після завершення цього етапу біодизель можна використовувати.

#### Висновки до розділу

1. Показано, що на швидкість приросту біомаси та метаболізм клітин *Chlorella vulgaris* одночасно впливає співвідношення діапазону хвиль освітлення, опромінення ультразвуковими частотами та джерело нітрогену. Найвища швидкість росту біомаси спостерігається за таких умов культивування: періодичного опромінення ультразвуком частотою 20 кГц, одночасного використання природного та штучного освітлення комбінацією світлодіодів червоні/сині/зелені (2:1:1) та суміші  $\text{NH}_4\text{Cl}:\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  у співвідношенні за нітрогеном 1:1. Зміна співвідношення комбінації довжин

хвиль світлодіодів на (1:1:1) призводить до зниження приросту біомаси на  $33 \pm 2\%$ . Вплив зміни співвідношення джерел нітрогену залежить від комбінації світлодіодів. За використання комбінації (2:1:1) приріст біомаси зменшується на  $44 \pm 3\%$  при будь-якому відхиленні, за комбінації (1:1:1) збільшується при збільшенні концентрації іонів амонію.

2. Визначено, що процес біосинтезу ліпідної фракції має прямо пропорційну залежність від концентрації іонів амонію. Заміна сечовини як джерела нітрогену на іон амонію збільшує вміст ліпідів на  $66 \pm 3\%$ . Зміна комбінації світлодіодів червоні/сині/зелені (2:1:1) на (1:1:1) призводить до зниження вмісту ліпідів на  $30 \pm 5\%$  в залежності від концентрації іонів амонію.

3. Вперше показано, що сумісна дія фізичних факторів впливає на якісний склад вищих жирних кислот ліпідної фракції. За використання освітлення комбінацією світлодіодів червоні/сині/зелені (1:1:1) збільшується вміст насичених жирних кислот і зменшується в 1,62 рази вміст ненасичених по відношенню до культури, що вирощена за використання природного освітлення. Сумісна дія ультразвукового опромінення та освітлення комбінацією світлодіодів (1:1:1) призводить до збільшення вмісту насичених жирних кислот до  $90,55 \pm 1,0\%$ , що 10% вище, ніж при застосуванні тільки освітлення світлодіодами.

4. Експериментально одержані дані стали підґрунтям для розробки біотехнології культивування мікроводорості *Chlorella vulgaris* з підвищеним вмістом ліпідної фракції для отримання з них біодизельного палива. Запропоновано технологічну та відповідно їй апаратурну схеми отримання біодизельного палива з мікроводоростей.

За результатами дослідження, що наведені в розділі, одержано патент на винахід [149].

## ВИСНОВКИ

Отримані теоретичні та експериментальні результати стали підґрунтям для вирішення важливої науково-технологічної проблеми підвищення вмісту ліпідної фракції у клітинах розповсюдженої в Україні мікроводорості *Chlorella vulgaris*, що дозволило створити ефективну біотехнологію культивування мікроводоростей з високим вмістом ліпідів, як вихідної сировини для отримання біодизельного палива.

1. Обґрунтовано та експериментально доведено вплив опромінення звуковими та ультразвуковими хвилями різної частоти на метаболізм клітин мікроводоростей *Chlorella vulgaris* та підвищення швидкості біосинтетичних процесів. Показано, що опромінення хвилями звукових частот  $5 \div 15$  кГц дозволяє підвищити вміст ліпідної фракції в клітинах у  $1,5 \div 2$  рази по відношенню до неопроміненої культури. Встановлено, що нетривала дія опромінення ультразвуковими хвилями частотою  $20 \div 25$  кГц призводить як до підвищеного приросту біомаси *Chlorella vulgaris*, так і до інтенсифікації біосинтезу ліпідів. Питомий вміст ліпідів у клітинах досягає 80% при опроміненні хвилями частотою 22,5 кГц. При підвищенні чи зниженні частоти опромінення вміст ліпідів зменшується до 55% при 20 кГц та 32% при 25 кГц. Дія опромінення ультразвуковими хвилями дає змогу створити умови для зміни метаболізму клітин в бік утворення ліпідної фракції і можливості використання *Chlorella vulgaris* як продуцента сировини для отримання біодизельного палива.

2. Встановлено, що дія ультразвуку ( $20 \div 25$  кГц) призводить до підвищення швидкості біосинтезу і приросту біомаси. Підвищення частоти ультразвукового опромінення більше 20 кГц призводить до зниження приросту біомаси у 3 рази при 22,5 кГц та 3,5 рази при 25 кГц. Одержані результати свідчать, що раціональним параметром процесу культивування мікроводоростей *Chlorella vulgaris* з підвищеним вмістом ліпідів є опромінення культури ультразвуком частотою 20 кГц.

3. Показано, що опромінення комбінаціями світлодіодів з перевагою червоного кольору (синій/червоний 2:3; синій/жовтий/червоний/помаранчевий, 2:2:5:1) підвищує біосинтез хлорофілу *a* у 2 рази у порівнянні з природним освітленням. Вперше встановлено, що найвищий приріст біомаси характерний для культивування мікродорості *Chlorella vulgaris* за використання комбінації світлодіодів червоний/синій/зелений у співвідношенні 2:1:1 при інтенсивності освітлення  $950 \pm 50$  люкс. Використання такої комбінації світлодіодів окремо або разом з природним світлом дає змогу підвищити швидкість засвоєння  $\text{CO}_2$  та накопичення біомаси у 1,3 – 2,6 разів у порівнянні з іншими комбінаціями світлодіодів.

4. Визначено, що процес біосинтезу ліпідної фракції має прямо пропорційну залежність від концентрації іонів амонію. Заміна сечовини як джерела нітрогену на іони амонію збільшує вміст ліпідів на  $66 \pm 3\%$ . За використання іонів амонію як джерела нітрогену вміст ліпідів у клітинах *Chlorella vulgaris* досягає  $43,4 \pm 0,5\%$ .

5. Вперше показано залежність метаболізму клітин *Chlorella vulgaris* від одночасної дії фізичних (освітлення комбінацією світлодіодів та опромінення ультразвуком) та хімічних (джерело нітрогену) факторів – раціональними є такі умови культивування: періодичне опромінення ультразвуком частотою 20 кГц, одночасне використання природного та штучного освітлення комбінацією світлодіодів червоні/сині/зелені (2:1:1) та суміші  $\text{NH}_4\text{Cl}:\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  у співвідношенні за нітрогеном 1:1.

6. Вперше показано, що сумісна дія фізичних факторів впливає на якісний склад вищих жирних кислот ліпідної фракції. За використання освітлення комбінацією світлодіодів червоні/сині/зелені (1:1:1) збільшується вміст насичених жирних кислот до  $81,0 \pm 1,0\%$  і зменшується в 1,62 рази вміст ненасичених у порівнянні до культури, що вирощена за використання природного освітлення. Сумісна дія ультразвукового опромінення та освітлення комбінацією світлодіодів (1:1:1) призводить до збільшення вмісту

насичених жирних кислот до  $90,55 \pm 1,0\%$ , що на 10% вище, ніж при застосуванні тільки освітлення світлодіодами. Це дає змогу отримати біодизельне паливо без застосування гідрогенізації сировини для підвищення виходу насичених жирних кислот.

7. Визначено параметри біотехнологічного процесу культивування мікроводорості *Chlorella vulgaris* з підвищеним вмістом ліпідної фракції для отримання біодизельного палива: температура  $30 \pm 2$  °C, періодична подача CO<sub>2</sub>, освітлення комбінацією світлодіодів червоні/сині/зелені у співвідношенні (2:1:1), періодичне опромінення ультразвуком частотою 20 кГц, рН =  $7,3 \pm 0,2$ , еквімолярна суміш за нітрогеном NH<sub>4</sub>Cl/CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>. Обґрунтовано і запропоновано технологічну та відповідну їй апаратурну схеми культивування мікроводоростей з підвищеним вмістом ліпідів та отримання біодизельного палива. Розроблену технологію апробовано на підприємстві ТОВ «Авангард», Черкаська область, Жашківський район, що підтверджено актами впровадження від 06.09.2016 р. Наукові результати роботи впроваджено у навчальному процесі для студентів спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» спеціалізації «Екологічна біотехнологія та біоенергетика» Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» (акт впровадження від 08.09.2016 р.).

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Баланда О. В. Загальний вміст ліпідів у зелених і синьо-зелених водоростях в умовах лабораторного культивування / О. В. Баланда, А. Г. Маєвська, О. А. Марченко, Т. І. Сушло, О. В. Бабушок. // Наукові доповіді НУБіП. – 2011. – № 9.
2. Harwood J. L. Lipid Metabolism in Algae. In *Advances in Botanical Research* / J.A. Callow, // Academic Press: Waltham, MA. – 1989. – Vol. 16. – № 3. – P. 1–53.
3. Золотарьова О. К. Перспективи використання мікрводоростей у біотехнології / О.К. Золотарьова, Г.І. Шнюкова, О. О. Сиваш, Н. Ф. Михайленко; під ред.О.К.Золотарьової // К.:Альтерпрес. – 2008. – 235 с.
4. Chisti Y. Biodiesel from microalgae / Y. Chisti // *Biotechnology Advances*. - 2007. – Vol. 25. – № 3. – P. 294–306.
5. Schenk P. M. Second generation biofuels: High-efficiency microalgae for biodiesel production / P.M. Schenk, S.R. Thomas-Hall, E. Stephens, U. Marx, J. Mussgnug, C. Posten, O. Kruse, B. Hankamer // *BioEnergy Res*. – 2008. Vol. 1. – № 5. – P. 20–43.
6. Krienitz L. The high content of polyunsaturated fatty acids in *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae) and its implication for food web interactions, freshwater aquaculture and biotechnology / L. Krienitz, M. Wirth // *Science Direct*. – 2006. – Vol. 36. – № 3. – P. 204–210.
7. Эльпинер И. Е. Ультразвук. Физико-химическое и биологическое действие / И.Е. Эльпинер // М., Физматгиз. – 1963. – 490 с.
8. Горда А. І. Біосинтез вуглеводів, білків і ліпідів у *Chlorella vulgaris Beijer*. за дії іонів важких металів / А. І. Горда, К. В. Костюк, В. В. Грубінко // Наукові записки ТНПУ ім. В. Гнатюка. Сер. Біологія / редкол.: М. М. Барна, В. В. Грубінко, В. З. Курант та ін. // Тернопіль. – 2010. – Вип. 2. – № 43. – С. 108-115.
9. Beadle C.L. Photosynthesis is it limiting to biomass production? / C.L. Beadle, S.P. Long// *Biomass*. - 1985. – Vol. 8. – № 12. – P. 119-168.



10. Solovchenko A. E. Physiological Role of Neutral Lipid Accumulation in Eukaryotic Microalgae under Stresses / Solovchenko A. E. // Russian journal of plant physiology. – 2012. – Vol. 59. – № 2. – P. 192-202.
11. Beadle C.L. Photosynthesis is it limiting to biomass production? / C.L. Beadle, S.P. Long // Biomass. – 1985. – Vol. 8. – № 1. – P. 119-168.
12. Harwood J.L. Lipid Metabolism in Algae. In Advances in Botanical Research / J.A. Callow, // Academic Press: Waltham, MA, USA. – 1989. – Vol. 16. – № 7. – P. 1–53.
13. Muradyan, E. A. Changes in Lipid Metabolism during Adaptation of the *Dunaliella salina* Photosynthetic Apparatus to High CO<sub>2</sub> / E. A. Muradyan, , G. L. Klyachko-Gurvich, L. N. Tsoglin, T. V. Sergeenko, N. A. Pronina. // Concentration, Russ. J. Plant Physiol. – 2004. – Vol. 51. – № 3. – P. 53–62.
14. Costa, J.A. The Role of Biochemical Engineering in the Production of Biofuels from Microalgae. / J. A. V. Costa, M.G. de Morais. // Bioresour. Technol. – 2011. – Vol. 102. – № 1. – P. 2–9.
15. Bigogno, C. Accumulation of Arachidonic Acid Rich Triacylglycerols in the Microalga *Parietochloris incisa* (Trebuxiophyceae, Chlorophyta). / C. Bigogno, I. Khozin-Goldberg, Z. Cohen. // Phytochemistry. – 2002. – Vol. 60. – № 2. – P. 135–143.
16. Harwood, J., Involvement of Chloroplast Lipids in the Reaction of Plants Submitted to Stress, Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics. / J. Harwood, P. A. Sigenthaler., N. Murata // Eds., Berlin: Springer-Verlag. – 2004. – P. 287–302.
17. Joyce E. M. Effect of ultrasonic frequency and power on algae suspensions. / E. M. Joyce, Wu X, T. J. Mason. // Faculty of Health and Life Sciences, Coventry University, Coventry, United Kingdom, online. – 2010. – Vol. 45. – № 7. – P. 863-866.
18. Lee T. J. Ultrasonic irradiation for blue-green algae bloom control / T. J. Lee, K. Nakano, M. Matsumara. // Environmental Technol. – 2001. – Vol. 22. – № 4. – P. 383-390.

19. Ahn C.Y., Growth inhibition of Cyanobacteria by ultrasonic radiation: laboratory and enclosure studies. / C.Y. Ahn, M.H. Park, S.H. Joung, H.S. Kim, K.Y. Jang, H.M. Oh. // *Environ Sci Technol.* – 2003. – Vol. 37. – № 13. – P. 3031-3037.
20. Suchkova E., Effect of ultrasonic treatment on metabolic activity of *Propionibacterium shermanii*, cultivated in nutrient medium based on milk whey / E. Suchkova, B. Shershenkov, D. Baranenko. // *Agronomy Research.* – 2014. – Vol. 12. – № 3. – P. 813–820.
21. Jachlewski S. The effect of ultrasound at 256 KHz on *Microcystis aeruginosa*, with and without gas vacuoles / S. Jachlewski, M. Botes, T. E. Cloete // *Water SA.* – 2013. – Vol. 39. – № 1. – P. 171-174.
22. Yaldagard M. Influence of ultrasonic stimulation on the germination of barley seed and its alpha-amylase activity. / M. Yaldagard, S. A. Mortazavi, F. Tabatabaie. // *African Journal of Biotechnology.* – 2008. – Vol. 7. – № 14. – P. 465-471.
23. Aladjadjiyan A. Ultrasonic stimulation of the development of lentils and wheat seedlings. / A. Aladjadjiyan. // *Romanian j. Biophys.* – 2011. – Vol. 21. – № 3. – P. 179–187.
24. Al-Tae. N. E., Ultrasonic Waves Stimulate the Activity of Thymine Nucleotide Biosynthetic Enzymes, Nucleic Acids and Proteins Content of *Sesamum Indicum L.* Stem Calli. / N. E. Al-Tae, S. A. Abood, M/ K. Al-Mallah. // *Pure Sciences.* – 2013. – Vol. 39. – № 1. – P. 91-97.
25. Klomklieng W. Molasses fermentation to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* M30 using low ultrasonic frequency stimulation / W. Klomklieng, A. Prateepasen // *KKU Research J.* – 2012. – Vol. 17. – № 6. – P. 950-957.
26. Патент на винахід № 2328119 (RU), C12N13, C12N1/18, A21D8/02. Способ активации дрожжей / Малишевский А. О. (RU), Санина Т. В. (RU), Алехина Н. Н. (RU), Скрынникова Ю. В. (RU), Черемушкина И. В. (RU), Варнаков А. Е. (RU) - Заявка № 2000124844/13, 15.01.2007; Оп. 10.07.2008 р.
27. Chuanyun D., Low ultrasonic stimulates fermentation of riboflavin producing strain *Ecemothecium ashbyii* / D/ Chuanyun, W/ Bochu, D. Chuanren, A. Sakanishi // *Colloids and surfaces B: Biointerfaces.* – 2003. – Vol. 30. – № 1-2. – P. 37-41.

28. Hu H., Influences of ultrasound and Ohmic heating on growth of Sake yeast / H. Hu, Y. Yonezawa, A. Matsuda, N. Ishida, A. Noguchi // Food Science and Technology International, Tokyo. – 2012. – Vol. 18. – № 5. – P. 611-616.
29. Kwiatkowska B., Stimulation of Bioprocesses by Ultrasound / B. Kwiatkowska, J. Bennett, J/ Akunna, G/ M. Walker, D. H. Bremner. // Biotechnol Adv. – 2011. – Vol. 29. – № 6. – P. 768-780.
30. Sulaiman A.Z. Ultrasound-assisted fermentation enhances bioethanol productivity / A. Z. Sulaimana, A. Ajit, R. M. Yunus, Y. Chisti // Biochemical Engineering Journal. – 2011. – Vol. 54. – № 2. – P. 141-150.
31. Radel S., Viability of yeast cells in well controlled propagating and standing ultrasonic plane waves / S. Radel, A.J. McLoughlin, L. Gherardini, O. Doblhoff-Dier, E. Benes // Ultrasonics. – 2000. – Vol. 38. – № 7. – P. 633–637.
32. Anderson J.M., Effects of ultrasonic radiation on growth and fermentation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae* // Biochimica et Biophysica Acta. – 1953. – Vol. 11. – № 12. – P. 122–137.
33. Gao Di. Ultrasound-Triggered Phase-Transition Cationic Nanodroplets for Enhanced Gene Delivery / Di Gao, Ming Xu, Zhong Cao, Jinbiao Gao, Ya Chen, Yingqin Li, Zhe Yang, Xiaoyan Xie, Qing Jiang, Wei Wang, Jie Liu, // American Chemical Society. – 2015. – Vol. 7. – № 24. – P. 13524–13537
34. Yiyao Liu. Ultrasound: mechanical gene transfer into plant cells by sonoporation. / Yiyao Liu, H. Yang, A. Sakanishi // Biotechnology Advances. – 2006. – Vol. 24. – № 1. – P. 1–16
35. Joersbo M. Direct gene transfer to plant protoplast by mild sonication. / M. Joersbo, J. Brunstedt // Plant Cell Rep. – 1990.– № 9. – P. 207–210
36. Taiz L. The Effectiveness of Ultrasound Treatment on the Germination Stimulation of Barley Seed and its Alpha-Amylase Activity/ L.Taiz, J. E. Starks, // International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering. – 2007. – Vol. 1. – № 10. – P. 123–126
37. Y Zhao. Study On The Cell Suspension System And Mutagenic Effects Of Ultrasound On *Gynostemma Pentaphyllum*(Thunb.)Makino / Y Zhao, // Shaanxi

Normal University. – 2007.

38. Becker E.W. Microalgae: biotechnology and microbiology / E. W. Becker. – Cambridge University Press, ISBN 0521350204. – 1994. – 301 p.

39. Упитис В.В. Макро- и микроэлементы в оптимизации минерального питания микроводорослей / В. В. Упитис. – Рига: Знание, – 1983. – 239 с.

40. Grobbelaar J.U. Algal nutrition. In: Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology: [editor Richmond A.]. – Blackwell. – 2004. – P. 97–115.

41. Martinez F. Interactions between Glucose and Inorganic Carbon Metabolism in *Chlorella vulgaris* Strain UAM 1011/ F. Martinez, M. I. Orus // Plant Physiol. – 1991. – № 95. – P. 1150–1155.

42. Shi X.M. Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources / X-M. Shi, X-W. Zhang, F. Chen // Enzyme Microbial. Technol. – 2000. – Vol. 27. – № 3–5. – P. 312–318.

43. Xin L. Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalga *Scenedesmus sp.* LX1 under different kinds of nitrogen sources / L. Xin, H-Y. Hu, K. Gan, J. Yang // Ecolog. Engineer. – 2010. – Vol. 36. – № 4. – P. 379–381.

44. Gribovskaja I.V. Usage of urina in food *Chlorella vulgaris* / I. V. Gribovskaja, G. S. Kalacheva, L. S. Tirranen, A. A. Kolmakova [at al.] // J. Siberian Federal University. Biolog. – 2011. – № 3. – P. 243–256.

45. Fung K. S. Optimization of Nutrient Media Composition for Microalgae Biomass Production Using Central Composite Design / K. S. Fung, H. N. Ling Ngee, E. L. Wan Teng. // Chemeca. – 2013. – P. 1–5

46. Su C.H. A novel approach for medium formulation for growth of a microalga using motile intensity / C.H. Su, R. Giridhar, C.W. Chen, W.T. Wu // Bioresource Technology. – 2007. – Vol. 98. – № 16. – P. 3012–3016.

47. Tam N. F. Y. Effect of ammonia concentrations on growth of *Chlorella vulgaris* and nitrogen removal from media / N.F.Y. Tam, Y.S. Wong // Elsevier. – 1996. – Vol. 57. – № 1. – P. 45–50.

48. Lin Q. Effects of nitrogen source and concentration on biomass and oil

production of a *Scenedesmus rubescens* like microalga / Q. Lin, J. Lin // Bioresource Technol. – 2011. – Vol. 102. – № 2. – P. 1615–1621.

49. González-Garcinuño Á. Effect of nitrogen source on growth and lipid accumulation in *Scenedesmus abundans* and *Chlorella ellipsoidea* / Á. González-Garcinuño, A Tabernero, J.M. Sánchez-Álvarez, E.M. Martin del Valle, M.A. Galán // Bioresour Technol. – 2014. – № 173. – P. 334–347.

50. Ortiz Montoya E. Y. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* for biodiesel production / E. Y. Ortiz Montoyaa, J. C. Monteiro de Carvalho, A. Converti // Elsevier. – 2009. – Vol. 48. – № 6. – P. 1146–1151.

51. Kiran B. Influence of varying nitrogen levels on lipid accumulation in *Chlorella sp.* / B. Kiran, K. Pathak, R. Kumar, D. Deshmukh, N. Rani // International Journal of Environmental Science and Technology – 2016. – Vol. 13. – P. 1–15.

52. Belotti G. Effect of nitrogen and phosphorous starvations on *Chlorella vulgaris* lipid productivity and quantity under different tropic regimens for biodiesel production. / G. Belotti, M. Barvi, D.B. Caprariis, D.P. Filippis, M. Scarsella // Am J Plant Sci. – 2013. – № 4. – P. 44–51.

53. Nadia F. Amin. Effect of Some Nitrogen Sources on Growth and Lipid of Microalgae *Chlorella sp.* for Biodiesel Production / Nadia F. Amin, Mohamed A. Khalafallah, Mohamed Abdelalim Ali, Ibrahim A. Matter // Journal of Applied Sciences Research. – 2013. – Vol. 9. – № 8. – P. 4845–4855.

54. Akpor O.B. Phosphorus and nitrate removal by selected wastewater protozoa isolates. Pakistan Journal of Biological Sciences / O.B. Akpor, M.N.B. Momba, J. Okonkwo // Pakistan Journal of Biological Sciences. – 2007. – Vol. 10. – № 22. – P. 4008–4014.

55. Anna L Stephenson. Influence of nitrogen-limitation regime on the production by *Chlorella vulgaris* of lipids for biodiesel feedstocks / Anna L Stephenson, John S Dennis, Christopher J Howe, Stuart A Scott, Alison G Smith // Biofuels. – 2014. – Vol. 1. – № 1. – P. 47–58.

56. Agwa O.K. Influence of Various Nitrogen Sources on Biomass and Lipid

Production by *Chlorella vulgaris* / O.K. Agwa, G.O. Abu. // British Biotechnology Journal. – 2016. – Vol. 15. – № 2. – P. 1–13.

57. Anondho Wijanarko. Effect of the Presence of Substituted Urea and also Ammonia as Nitrogen Source in Cultivated Medium on *Chlorella*'s Lipid Content / Anondho Wijanarko // Progress in Biomass and Bioenergy Production. – 2011. – P. 1–10.

58. Rui Serra-Maia. Influence of temperature on *Chlorella vulgaris* growth and mortality rates in a photobioreactor / Rui Serra-Maia, Olivier Bernard, Ana Gonçalves, Sakina Bensalem, Filipa Lopes // Elsevier. – 2016. – Vol. 18. – P. 352–359.

59. Soldatini G.F. Sulfite: Preferential sulfur source and modifier of CO<sub>2</sub> fixation in *Chlorella vulgaris* / G. F. Soldatini, I. Ziegler, H. Ziegler // Planta. – 1978. – Vol. 143. – № 2. – P. 225–231.

60. Yang S. Effects of bisulfite and sulfite on the microalga *Botryococcus braunii* / S. Yang, J. Wang, W. Cong, Z. Cai [et al.] // Enzyme Microbial. Technol. – 2004. – Vol. 35. – № 1. – P. 46– 50.

61. Richard M. Cooper. Elemental sulphur as an induced antifungal substance in plant defence / Richard M. Cooper, Jane S. Williams // Journal of Experimental Botany. – 2004. – Vol. 55. – № 404. – P. 1947–1953.

62. Scott S.A. Biodiesel from algae: challenges and prospects / S. A Scott, M. P. Davey, J. S. Dennis, I. Horst [et al.] // Current Opinion Biotechnol. – 2010. – Vol. 21. – № 3. – P. 277–286.

63. Басова М. М. Жирнокислотный состав липидов некоторых видов микроводорослей / М.М. Басова // Альгология. – 2005. – № 4. – С. 415–436.

64. Біохімія: підруч. [для студ.вищ. навч. закл.] / [М. Є. Кучеренко, Ю. Д. Бібенюк, О. М. Васильев та ін.]. – К.: ВПЦ Київський університет. – 2002. – 480 с.

65. Siron R. Changes in the fatty acid composition of *Phaeodactylum tricorutum* and *Dunaliella tertiolecta* during growth and under phosphorus deficiency / R. Siron, G. Giusti, B. Berland // Marine Ecology Progress. – 1989. – vol. 55. – № 1.

– P. 95–100.

66. Mayo A.W. Effects of temperature and pH on the kinetic growth of unialgal *Chlorella vulgaris* cultures containing bacteria / A.W. Mayo // Water Environ. Research. – 1997. – Vol. 69. – № 1. – P. 64–72.

67. Цоглин Л.Н. Особенности роста *Chlorella sp.* / Л.Н. Цоглин, В.Е. Семеновко, Л.П. Каюшин, В.П. Кутышенко, А.В. Лазарева, М.С.Окон, А.А. Сибельдина, Л.Н. Чекулаева // К. Физиология растений. – 1973. – № 8. – P. 1204–1207.

68. Choi B. Optimum conditions for cultivation of *Chlorella sp.* FC-21 using light emitting diodes / B. Choi, J.-H. Lim, J. Lee, T. Lee // Korean J. Chem. Eng. – 2013. – Vol. 30 – № 8. – P. 1614–1619.

69. Blair M.F. Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production / M. F. Blair, B. Kokabian, V. G. Gude // Journal of Environmental Chemical Engineering. – 2014. – Vol. 2. – № 2. – P. 665–674.

70. Allen Killam. A Special Effect of Light on the Growth of *Chlorella vulgaris* / Allen Killam, Jack Myers // American Journal of Botany. – 2010. – Vol. 43. – № 8. – P. 569–572.

71. Arezoo Khalili. Influence of nutrients and LED light intensities on biomass production of microalgae *Chlorella vulgaris* / Arezoo Khalili, Ghasem D. Najafpour, Ghazaleh Amini, Faezeh Samkhaniyani // Biotechnol Bioproc E. – 2015. – Vol. 20. – № 2. – P. 284–290.

72. Feng P. Lipid accumulation and growth characteristics of *Chlorella zofingiensis* under different nitrate and phosphate concentrations / Feng, P., Z. Deng, L. Fan, and Z. Hu // J. Biosci. Bioeng. – 2012. – № 114. – P. 405–410.

73. Cheirsilp B. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation / B. Cheirsilp, S. Torpee // Bioresour. Technol. – 2012. – № 110. – P. 510–516.

74. Zhao Y. Effects of various LED light wavelengths and intensities on microalgae-based simultaneous biogas upgrading and digestate nutrient reduction process /

- Y. Zhao, J. Wang, H. Zhang, C. Yan, Y. Zhang // *Bioresour. Technol.* – 2013.– № 136. – P. 461–468.
75. Pruvost J. Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor / J. Pruvost, G. Van Vooren, G. Cogne, J. Legrand // *Bioresour. Technol.* – 2009.– № 100. – P. 5988–5995.
76. Carvalho A.P. Light requirements in microalgal photobioreactors: An overview of biophotonic aspects / A.P. Carvalho, S.O. Silva, J.M. Baptista, F.X. Malcata // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2011.– № 89. – P. 1275–1288.
77. Jeong H. Energy efficient growth control of microalgae using photobiological methods / H. Jeong, J. Lee, M. Cha // *Renewable Energy.* – 2012.– № 54. – P. 161–165.
78. Chen C.Y. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review / C.Y. Chen, K.L. Yeh, R. Aisyah, D.J. Lee, J.S. Chang // *Bioresour. Technol.* – 2011. – Vol. 201. – № 3. – P. 71–81.
79. Cheirsilp B. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation / B.Cheirsilp, S.Torpee // *Bioresour. Technol.* – 2012. – Vol. 110. – № 12. – P. 510–516.
80. Wang B. Biomass production and nitrogen and phosphorus removal by the green alga *Neochloris oleoabundans* in simulated wastewater and secondary municipal wastewater effluent / B. Wang, C.Q. Lan, // *Bioresour. Technol.* – 2011. – Vol. 102. – № 10 P. 5639–5644.
81. Das P. Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light / P. Das, W. Lei, S.S. Aziz, J.P. Obbard // *Bioresour. Technol.* – 2011. – Vol. 102. – № 9. – P. 3883–3887.
82. Barghbani R. Investigating the effects of several parameters on the growth of *Chlorella vulgaris* using Taguchi's experimental approach / R. Barghbani, K. Rezaei, A. Javanshir // *Int. J. Biotechnol. Wellness Ind.* – 2012. – Vol. 1. – № 4. – P. 128–133.
83. Sirisansaneeyakul S. Photoautotrophic production of lipids by some *chlorella*



- strains / S. Sirisansaneeyakul, S. Singhasuwan, W. Choorit, N. Phoopat, J. Garcia, Y. Chisti, // *Mar. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 13. – № 3. – P. 928–941
84. Zheng H. Effect of inorganic carbon source on lipid production with autotrophic *Chlorella vulgaris* / H. Zheng, Z. Gao, Q. Zhang, H. Huang, X. Ji, H. Sun, C. Dou, // *Biotechnol.* – 2011. – Vol. 27. – № 5. – P. 436–444.
85. Yeh K. Effect of light supply and carbon source on cell growth and cellular composition of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31 / K. Yeh, J. Chang, W. Chen, // *Eng. Life Sci.* – 2010. – Vol. 10. – № 6. – P. 201–208.
86. Aishvarya V. Enhanced inorganic carbon uptake by *Chlorella sp.* IMMTCC-2 under autotrophic conditions for lipid production and CO<sub>2</sub> sequestration / V. Aishvarya, N. Pradhan, R.R. Nayak, L.B. Sukla, B.K. Mishra, // *J. Appl. Phycol.* – 2012. – № 3. – P. 1–9.
87. Li X. Effect of LED's red/blue light on the growth characteristic and lipid production of *Scenedesmus sp. LX1* / Li X1, Hu HY, Yang J. // *Huan Jing Ke Xue.* – 2010. – Vol. 31. – № 2. – P. 513–519.
88. Peter S.C. Schulze. Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production / Peter S.C. Schulze, Luísa A. Barreira, Hugo G.C. Pereira, José A. Perales, João C.S. Varela1. // *Trends Biotechnol.* – 2014. – Vol. 32. – № 8. – P. 422–430.
89. Terashima I. Green Light Drives Leaf Photosynthesis More Efficiently than Red Light in Strong White Light: Revisiting the Enigmatic Question of Why Leaves are Green / Ichiro Terashima, Takashi Fujita, Takeshi Inoue, Wah Soon Chow, Riichi Oguchi. // *Plant & cell physiology.* – 2009. – Vol. 50. – № 4. – P. 684–697.
90. Muneer S. Influence of Green, Red and Blue Light Emitting Diodes on Multiprotein Complex Proteins and Photosynthetic Activity under Different Light Intensities in Lettuce Leaves (*Lactuca sativa* L.) / S. Muneer, E. J. Kim, J. S. Park, J. H. Lee. // *Molecular sciences.* – 2014. – Vol. 15. – № 3. – P. 4657–4670.
91. Zhang T. Green Light Induces Shade Avoidance Symptoms / T. Zhang, S. A. Maruhnich, K. M. Folta. // *Plant Physiol.* – 2011. – Vol. 157. – № 3. – P. 1528–1536.
92. Folta K.M. Green Light Effects on Plant Growth and Development / Kevin M.

- Folta. // *Light Sensing in Plants*. – 2005. – P. 239-242. ISBN 978-4-431-24002-0.
93. Wang Y. Contributions of green light to plant growth and development. / Y. Wang, K.M. Folta // *American journal of botany*. – 2013. – Vol. 100. – № 1. – P. 70–78.
94. The light plant needs // National Aeronautics and Space Administration Educator Guide. . – P.1– 26. EG-2010-07-010-LaRC.
95. Anjala M. Gammanpila. Light Intensity And Photo Period Effect On Growth And Lipid Accumulation Of Microalgae *Chlorella Vulgaris* And *Nannochloropsis Sp.* For Biodiesel Production / Anjala M. Gammanpila, Chintha P. Rupasinghe, Siripala Subasinghe // *Proceedings of 12th ISERD International Conference*. – 2015. – № 12. – P. 51–55.
96. Zahra Amini Khoeyi. Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris* / Zahra Amini Khoeyi, Jafar Seyfabadi, Zohreh Ramezanpour // *Aquaculture International*. – 2011. – Vol. 20. – № 1. – P. 153–157.
97. Izabela Krzemińska. Cultivation of *Chlorella protothecoides* in photobioreactors: The combined impact of photoperiod and CO<sub>2</sub> concentration / Izabela Krzemińska, Agnieszka Nawrocka, Agata Piasecka, Paweł Jagielski, Jerzy Tys // *Engineering in life science*. – 2015. – Vol. 15. – № 5. – P. 533–541.
98. Mark W. Change in Photosynthetic Capacity over the Cell Cycle in Light/Dark Synchronized *Amphidinium carteri* Is Due Solely to the Photocycle / Mark W. Gerath, Sallie W. Chisholm // *Plant Physiol*. – 1989. – №91. – P. 999–1005.
99. Crofcheck C.L. Evaluating algal growth at different temperatures / O.C. Keelin., C.L. Crofcheck // *Biosystems and Agricultural Engineering*. – 2011. – Vol. 3. – P. 59.
100. Ma X. Effects of temperature and substrate concentration on lipid production by *Chlorella vulgaris* from enzymatic hydrolysates of lipid-extracted microalgal biomass residues (LMBRs) / X. Ma, H. Zheng, H. Huang, Y. Liu, R. Ruan // *Biochem Biotechnol*. – 2014. – Vol. 4. – P. 31–50.
101. Griffiths M.J. The effect of nitrogen limitation on lipid productivity and cell

composition in *Chlorella vulgaris* / M.J. Griffiths, R.P. Hille, S.T. Harrison // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2014. – Vol. 98. – № 5. – P. 2345–2356.

102. Converti A. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production / A. Converti, A.A. Casazza, E.Y. Ortiz, M.D. Borghi // *Chemical Engineering and Processing.* – 2009. – Vol. 48. – P. 1146–1151.

103. Robles-Heredia J.C. A multistage gradual nitrogenreduction strategy for increased lipid productivity and nitrogen removal in wastewater using *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* / J.C. Robles-Heredia, J.C. Sacramento-Rivero, Y. Canedo-López, A. Ruiz-Marín, L.E. Vilchiz-Bravo // *Brazilian Journal of Chemical Engineering.* – 2015. – Vol. 32. – № 2. – P. 335–345.

104. Царенко П.М. Краткий определитель хлорококковых водорослей Украинской ССР / П.М. Царенко // М., Паламарь-Мордвинцева. – 1990. – 208 с.

105. Патент на корисну модель № 98655 (UA), A01G 33/00, C12M 3/02. Установа для культивування мікрободоростей / Голуб Н.Б. (UA), Левтун І.І. (UA), Хворостина О.В. (UA) - Заявка № u201407870, 14.07.2014; Оп. 12.05.2015 р.

106. Патент на винахід № 2268923 (RU), C12M3/02, A01G33/00, C12N1/12. Установа для вирощування мікрободоростей / Богданов Н.І. (RU), Куницян М.В. (RU) - Заявку подано: 08.10.2004; Оп. 27.02.2006 р. 107. Куртієва З.С. Влияние микробиологического препарата «эмбико» на ацидофицирующую активность корней огурца / З.С. Куртієва, В.С. Ржевская, А.В. Омельченко // *Біологічно активні речовини та матеріали.* – 2013.– Том 1. – 384 с.

108. Технічний опис та інструкція експлуатації камери Горяєва ЭА0.000.851 ТО / Міністерство медичної промисловості. – 2013. – 10 с.

109. Кисличенко В.С. Пігменти трави грициків звичайних (*Capsella bursa-pastoris*) / Ю.С. Колісник, В.С. Кисличенко, В.Ю. Кузнецова // *Наукові публікації кафедри ХПС.* – 2013. – С. 75–77.

110. Гайдукевич О.М. Аналітична хімія / О.М. Гайдукевич, В.В. Болотов //

Харків “Основа”. – 2000. – С. 382–390.

111. Ritchie R. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents / R.J. Ritchie // *Photosynthesis Research*. – 2006. – Vol. 89. – P. 27–41.

112. Гаркавий В. Г. Математична статистика / В. Г. Гаркавий, В. В. Ярова // - К. : Професіонал, – 2004. – 484 с.

113. Хоменко А.Д. Біотехнологія культивування *Spirulina Platensis* за використання сироватки молока та застосування біомаси водорості у перепелівництві / А.Д. Хоменко // Білоцерківський національний аграрний університет. – 2015. – 155 с.

114. Li B. Effect of sound wave stress on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation of *Dendrobium candidum* / B. Li, J. Wei, X. Wei, K. Tang, Y. Liang, K. Shu, B. C. Wang // *Colloid Surface B*. – 2008. – Vol. 63. – P. 269–275.

115. Товстяк В.В. Механізми впливу електронів та акустичних полів на біологічні мембрани / Товстяк В.В. // Харківський державний університет. – 1999. – 37 с.

116. Wang B. Influence of sound stimulation on plasma membrane H<sup>+</sup>- ATPase activity / B. Wang, H. Zhao, X. Wang, C. Duan, D. Wang, A. Sakanishi // *Colloid Surface B*. – 2002. – Vol. 25. – P. 183–188.

117. Golub N.B. Impact of sound irradiation on *Chlorella vulgaris* cell metabolism / N.B. Golub, I.I. Levtun // *Eastern-European journal of enterprise technologies*. – 2016. – Vol. 80. – № 2. – P. 27–31.

118. Bochu W. Carrot cell growth response in a stimulated ultrasonic environment / W. Bochu, A. Yoshikoshi, A. Sakanishi // *Colloid. Surface B*. – 1998. – Vol. 12. – P. 89–95.

119. Голуб Н.Б. Підвищення вмісту ліпідів у клітинах *Chlorella vulgaris* / Н.Б. Голуб, И.И. Левтун // *Відновлювана енергетика*. – 2015, – Вид. 40, – №1, – С. 86–89.

120. Caner K. Use of RGB LEDs and Fluorescents Lamps as Light Sources to Grow Microalgae in a Photo-Bio Reactor (PBR) / K. Caner, Gary A. Anderson //

American Society of Agricultural and Biological Engineers. – 2010. – Vol 10. – №4 – P. 105.

121. Choi Y.K. LED light stress induced biomass and fatty acid production in microalgal biosystem, *Acutodesmus obliquus* / Y.K. Choi, R.S. Kumaran, H.J. Jeon, H.J. Song, Y.H. Yang, S.H. Lee, K.G. Song, K.J. Kim, V. Singh, H.J. Kim // *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* – 2015. – P. 45–53.

122. Caner K. Biodiesel Potential of *Chlorella Kessleri* Grown under LED and Fluorescent Illumination Sources / K. Caner, Gary A. Anderson, K. Bulent, V. Mustafa // *Journal of agricultural Machinery Science.* – 2011. – Vol 7. – № 4. – P. 355–360.

123. Tobias H. Disposable algae cultivation for high-value products using all around LED-illumination directly on the bags / H. Tobias, S. Bernhard, K. Michael, F. Björn // *Journal of Algal biomass utilization.* – 2014. – Vol 5. – № 2. – P. 66–73.

124. Levtun I.I. Influence of light energy wavelength on cultivation of *Chlorella vulgaris* / N.B. Golub, I.I. Levtun // *Вісник Національного університету «Львівська політехніка», серія «Хімія, технологія речовин та їх застосування».* – 2016. – Вип. 841. – С 138–144.

125. Przytocka-Jsiak M. Growth and survival of *Chlorella vulgaris* in high concentrations of nitrogen / M. Przytocka-Jsiak // *Acta Microbiol Pol.* – 2000. – Vol 25. – № 3. – P.287–289.

126. Sunjin K. Removal of nitrogen and phosphorus by *Chlorella sorokiniana* cultured heterotrophically in ammonia and nitrate / K. Sunjin, L. Yunhee, H. Sun-Jin // *International Biodeterioration & Biodegradation.* – 2013. – Vol 85. – P.511–516.

127. Rowley M. Nitrogen and phosphorus biomass-kinetic model for *Chlorella vulgaris* in a biofuel production scheme / M. Rowley // *Department of the air force air university.* – 2010. – P.3–111.

128. Gerardi M. Nitrification and Denitrification in the Activated Sludge Process / M. Gerardi // *John Wiley and sons. Inc.* – 2002. – P.192.

129. Gribovskaya L. Use of Urine in the Nutrition of *Chlorella Vulgaris* / L.

Gribovskaya, G. Kalachova, L.S. Tirranen, A.A. Kolmakova, Yu. Bayanova // *Biology*. – 2011. – Vol 4. – № 3. – P.243–256.

130. Nain Elvira-Antonio. Effect of Nitrogen Content and CO<sub>2</sub> Consumption Rate by Adding Sodium Carbonate in the Lipid Content of *Chlorella vulgaris* and *Neochloris oleoabundans* / Nain Elvira-Antonio, Alejandro Ruíz-Marí, Yunuen Canedo-López // *International Journal of Environmental Protection*. – 2013. – Vol 3. – № 10. – P.13–19.

131. Jinsoo K. Removal of Ammonia from Wastewater Effluent by *Chlorella vulgaris* / K. Jinsoo, P. Bala, R. Rachael, L. Joo-Youp, F. Kaniz // *Tsinghua science and technology*. – 2010. – Vol 15. – № 4. – P.391–396.

132. Hodson R. Metabolism of urea by *Chlorella vulgaris* / R. Hodson, J. Thompson // *Plant Physiol*. – 2000. – Vol 44. – № 5. – P.691–696.

133. Lütfiye K. Lipid Production from *Chlorella vulgaris* under Nitrogen-Limitation / K. Lütfiye, J. Glick, M/ Bracken, C. Lee-Parsons // *UVM*. – 2010. – Vol 1. – P.1–5.

134. Anondho Wijanarko. Effect of the Presence of Substituted Urea and also Ammonia as Nitrogen Source in Cultivated Medium on *Chlorella*'s Lipid Content / Anondho Wijanarko // *Progress in Biomass and Bioenergy Production*. – 2011. – № 14. – P.1–6.

135. Myers J. Carbon and nitrogen balance of *Chlorella* during growth / J. Myers, J. Johnston // *Plant physiology*. – 1949. – Vol 24. – № 1. – P.111–119.

136. Baker J. Assimilation of Ammonia by Nitrogen-Starved Cells of *Chlorella Vulgaris* / J. Baker, J. Thompson // *Plant physiology*. – 1961. – Vol 36. – № 2. – P.208–212.

137. Crofcheck C. Influence of media composition on the growth rate of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus* utilized for CO<sub>2</sub> mitigation / C. Crofcheck, A. Shea, M. Montross, M. Crocker, R. Andrews // *Biochem Tech*. – 2012. – Vol 4. – № 2. – P.589–594.

138. Голуб Н.Б. Науково-технологічні основи конверсії відновлюваної сировини в біоводень, біометан та біодизель / Н.Б. Голуб // НТУУ “КПІ”.

– 2015. УДК 577.23:620.95: 622.75.76.

139. Голуб Н.Б. Утилизация помета *Chlorella vulgaris* для получения биодизельного топлива / Н. Б. Голуб, И. И. Левтун, О. В. Хворостина // Вода и экология: проблемы и решения. – 2014. – № 1. – С.151–157.

140. Голуб Н.Б. Вплив джерела азотного живлення на приріст біомаси *Chlorella vulgaris* / Н. Б. Голуб, І. І. Левтун, Є. Д. Тимошенко // Наукові вісті. – 2015. – Vol 101. – № 3. – С.7–14.

141. Drekeke G. Poultry Manure Digestate Enhancement of *Chlorella Vulgaris* Biomass Under Mixotrophic Condition for Biofuel Production / Gene Drekeke Iyovo, Guocheng Du, Jian Chen // Journal of Microbial & Biochemical Technology. – 2010. – № 2. – P.51–57.

142. Yuting Tang. Efficient lipid extraction and quantification of fatty acids from algal biomass using accelerated solvent extraction (ASE) / Tang Yuting, Yue Zhang, Julian N. Rosenberg, Nadia Sharif, Michael J. Betenbaugh, Fei Wang // Royal society of chemistry. – 2016. – Vol 35. – № 6. – P. 291127–29134.

143. Semin O. Fatty acid Composition of *Chlorella* and *Spirulina* Microalgae Species / O. Semin, P. Ruhsen // Journal of AOAC International. – 2001. – Vol 84. – № 6. – P. 1708–1714.

144. Milner W.H. The Fatty acids of *Chlorella* / W.H. Milner // Biol. Chem. – 1948. – Vol 176. – P. 813–817.

145. Sakhno L.O. Variability in the fatty acid composition of rapeseed oil: Classical breeding and biotechnology/ L.O. Sakhno // Cytol. Genet.. – 2010. – Vol 44. – № 6. – P. 70–80.

146. Kang H. K. Effect of various forms of dietary *Chlorella* supplementation on growth performance, immune characteristics, and intestinal microflora population of broiler chickens / H. K. Kang, H. M. Salim, N. Akter, D. W. Kim, J. H. Kim, H. T. Bang, M. J. Kim, J. C. Na, J. Hwangbo, H. C. Choi, O. S. Suh // Applied poultry research. – 2012. – Vol 22. – № 1. – P. 100–108.

147. Кушнір С.В. Барботажний хімічний ефект і його вплив на властивості морської води / С.В. Кушнір, Р.П. Козак, М.В. Кость // Доповіді Національної

академії наук України. – 2015. – № 2. – Р. 89–95.

148. Ying Yang. Effects of CO<sub>2</sub> concentrations on the freshwater microalgae, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* (*Chlorophyta*) / Ying Yang, Kunshan Gao // Journal of Applied Phycology. – 2003. – Vol 15. – № 5. – Р. 379–389.

149. Патент України на винахід № 110770 UA, МПК (2006.01), C12N1/12, C12M1/42, C12R1/89. Спосіб культивування мікроводоростей *Chlorella vulgaris* / Голуб Н.Б., Левтун І.І. № а201509805; Заявл. 09.10.2015; Опубл. 10.02.2016; Бюл. № 2, 2016 р.



## Додаток А

Акт впровадження та використання результатів роботи

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Перший проректор НТУУ «КПІ»  
академік НАН України, проф.

Ю.І. Якименко  
« 02 » \_\_\_\_\_ 2016 р.

**АКТ**

Впровадження результатів дисертаційного дослідження аспіранта кафедри екобіотехнології та біоенергетики Левтуна Ігоря Ігоровича на тему «Біотехнологія культивування мікроводоростей *Chlorella vulgaris* з підвищеним вмістом ліпідів»

Комісія у складі:

Голова – завідувач кафедри екобіотехнології та біоенергетики НТУУ «КПІ», д.х.н. проф. Кузьмінський Є.В.

Члени комісії – проф., д.т.н., проф. Саблій Л.А.;

к.т.н., доц. Щурська К.О.;

ст.н.сп., к.б.н., доц. Гринюк І.І.

цим Актом засвідчує, що результати дисертаційного дослідження Левтуна Ігоря Ігоровича на тему: «Біотехнологія культивування мікроводоростей *Chlorella vulgaris* з підвищеним вмістом ліпідів» використані співробітниками кафедри екобіотехнології та біоенергетики факультету біотехнології та біотехніки Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут ім. Ігоря Сикорського» при підготовці і викладанні курсів лекцій «Переробка біомаси та відходів», «Водорості в біоенергетиці», при розробці лекцій, лабораторних та практичних занять для підготовки студентів за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія» спеціалізації «Екологічна біотехнологія та біоенергетика».

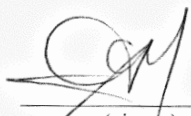
В навчальний процес було впроваджено:

- 1) вплив факторів середовища на зміну метаболізму мікроводоростей в бік підвищеного утворення ліпідної фракції;
- 2) методи підвищення продукування ліпідів;
- 3) параметри технологічного процесу культивування мікроводоростей з підвищеним вмістом ліпідної фракції;
- 4) особливості процесів культивування мікроводоростей за використання відходів як живильних речовин.

Впровадження отриманих за дисертаційною роботою Левтуна І.І. результатів дослідження в начальний процес підвищує якість підготовки студентів за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія» та спеціалізацією «Екологічна біотехнологія та біоенергетика», так як відображає стан та перспективи розвитку наукових досліджень в галузі біоенергетики в Україні та світі.

### Голова комісії

д.х.н., проф.  
(науковий ступінь, вчене звання)

  
(підпис)

Кузьмінський С.В.  
(прізвище та ініціали)

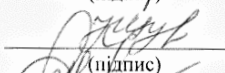
### Члени комісії

д.т.н., проф.  
(науковий ступінь, вчене звання)

  
(підпис)

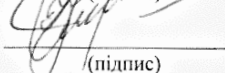
Саблій Л.А.  
(прізвище та ініціали)

к.т.н., доц.  
(науковий ступінь, вчене звання)

  
(підпис)

Щурська К.О.  
(прізвище та ініціали)


к.б.н., доц.  
(науковий ступінь, вчене звання)

  
(підпис)

Гринюк І.І.  
(прізвище та ініціали)

«08» вересня \_\_\_\_\_ 2016 р.

**ЗАТВЕРДЖУЮ**  
 Директор  
 ТОВ «Авангард»  
 \_\_\_\_\_ Запорожець П.О.  
 « 08 » серпень 2016 р.



### АКТ

впровадження технології  
 вирощування мікроводоростей з підвищеним вмістом ліпідів  
 на виробництві ТОВ «Авангард»

У період з січня 2016 року до серпня 2016 року на території ТОВ «Авангард» були проведені дослідження технології вирощування біомаси мікроводоростей для подальшого одержання біодизельного палива, добрива та кормової добавки до харчового раціону птахів.

Повітря, яке проходить очищення на фільтрах, через систему підігріву надходить до аератора і поступає у фотореактор, який містить ерліфтну систему. За допомогою повітря, що надходить, відбувається перемішування культурального середовища, що забезпечує рівномірне освітлення клітин мікроводоростей. Одночасно відбувається обігрів фотореактора до температури  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . Газ, збагачений киснем, поступає до повітропроводу відведення газу. При недостатньому природному освітленні та в період темряви використовуються комбінації світлодіодів червоного, синього та зеленого спектрів. Біля комплексу фотореакторів розташовано генератор низькочастотних ультразвукових хвиль, що має кут опромінення  $120^\circ$  і розташований вздовж поверхні реактора. Опромінення ультразвуковими хвилями проводять кожні 12 годин. Для забезпечення мікроводоростей поживними речовинами до фотореактора через дозатор надходить культуральне середовище з визначеними концентраціями елементів. У фотореакторі контролюється рН середовища, температура та густина суспензії. Після нарощування біомаси (час процесу - 12 годин) культуральна рідина з біомасою через трубопровід поступають до накопичувальної ємності і далі за допомогою компресора подається на центрифугу. Для забезпечення неперервності процесу частина мікроводоростей (чверть за об'ємом) залишається у фотореакторах. Після відокремлення рідини частина рідини використовується як напій для птахів, інша - як добриво. Біомаса мікроводоростей подається до сушарки і потім на олійницю.

У результаті впровадження технології вирощування мікроводоростей за використання топочних газів було встановлено:

1. Розроблена і впроваджена технологія забезпечує вирощування мікроводоростей з одночасним одержанням біодизельного пального, добрива та кормової добавки до харчового раціону птахів.
2. Використання ультразвукового опромінення низькими частотами дозволяє:

- змінити метаболізм клітин і підвищити вихід біомаси мікроводоростей
  - підвищити концентрацію ліпідів у клітинах мікроводоростей, що приводить до збільшення виходу біодизельного палива,
  - змінити якісний склад ліпідів зі збільшенням насичених жирних кислот, що підвищує якість біодизельного палива.
3. Використання світло діодів з визначеними довжинами хвиль дозволяє:
    - підвищити засвоюваність CO<sub>2</sub>, що підвищує швидкість біосинтетичних процесів і збільшує приріст біомаси
    - забезпечує мікроводорості світловою енергією необхідного діапазону для здійснення фотосинтетичних процесів у період темряви та недостатнього природного освітлення,
    - зменшує енергетичні витрати на освітлення.
  4. Використання аероліфтної системи дозволяє покращити доступ поживних речовин до клітин та не завдає їм шкоди.
  5. Використання модифікованого за нітрогеном культурального середовища Громова №6 дозволяє підвищити вихід біомаси та вміст насичених жирних кислот, що підвищує якість біодизельного палива.
  6. Одержання біодизельного пального з водоростей не вимагає використання складних технологій та устаткування.
  7. Впроваджена технологія зменшує енергетичні витрати з одночасним збільшенням продуктивності.
  8. Запропонована технологія культивування мікроводоростей з підвищеним вмістом ліпідів забезпечує стабільний вихід біомаси мікроводоростей з одночасним виробництвом біодизельного палива, високоякісної добавки до харчового раціону птахів та добрива. Продуктивність фото реактора забезпечує одержання 100 кг мікроводоростей за добу.

Головний інженер  
ТОВ «Авангард»



Бадрак В.П.

Професор кафедри екобіотехнології та  
біоенергетики НТУУ «КПІ»



Голуб Н.Б.

Аспірант кафедри екобіотехнології та  
біоенергетики НТУУ «КПІ»



Левтун І.І.

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Директор

ТОВ «Авангард»

Запорожець П.О.

« 06 » серпня 2016 р.**АКТ**

випробувань дослідно-промислової установки для вирощування мікроводоростей з підвищеним вмістом ліпідів

У період з січня 2016 року до серпня 2016 року на території ТОВ «Авангард» з метою впровадження технології вирощування біомаси мікроводоростей з підвищеним вмістом ліпідів для подальшого одержання біодизельного палива, добрива та кормової добавки до харчового раціону птахів проведені випробування дослідно-промислової установки.

Продуктивність дослідно-промислової установки становила 100 кг мікроводоростей за добу.

Дослідно-промислова установка включала блок попередньої підготовки поживного середовища; фотореактори, які з'єднані між собою через газопроводи для подачі через компресор барботажної суміші повітря, до якої періодично вносили визначений об'єм CO<sub>2</sub> з балону, та газів, що виходять з фотореакторів; систему відводу вирощеної біомаси. Комбінація світлодіодів червоного, синього та зеленого спектрів розміщена біля фотореакторів таким чином, щоб задовольнити потреби мікроводоростей у надходженні світлової енергії. Біля фотореакторів розміщено випромінювач, який випромінює частоти ультразвукового спектру. Також установка містила накопичувальну ємність для збору біомаси, насоси для перекачування її до центрифуги, транспортери для подачі до сушарки та олійниці.

Для запуску фотореакторів на початку роботи було внесено культуру мікроводорості *Chlorella vulgaris* та модифіковане за нітрогеном культуральне середовище Громова №6.

Для покращення масообмінних процесів у фотореакторі та рівномірного освітлення клітин мікроводоростей фотореактор містить систему ерліфту. Середовище барботували повітрям, яке попередньо підігрівали до 40°C за допомогою калорифера для підтримання температури у реакторі на рівні 28 ± 2°C. Комплекс фотореакторів двічі на добу опромінювали ультразвуковими хвилями низької частоти.

Для забезпечення неперервності процесу частину мікроводоростей (чверть за об'ємом) залишали у біореакторах. Відокремлення біомаси, що наросла, проводили кожні 12 годин.

Біомасу від культурального середовища відокремлювали за допомогою центрифуги. Частину рідини використовували як напій для птахів, іншу - як біодобриво.

Біомасу подавали до сушарки і потім до олійниці.

Результати випробувань дослідно-промислової установки для вирощування мікроводоростей з підвищеним вмістом ліпідів дозволяють зробити наступні висновки:

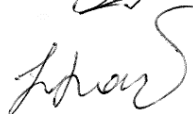
1. Спостереження за роботою дослідно-промислової установки, визначення щоденної продуктивності, систематичний контроль за складом культурального середовища, рН та приростом біомаси на виході показали, що установка працює стабільно.
2. Одержано високі показники приросту біомаси – 100 кг за добу.
3. Використання комбінації світлодіодів з визначеними довжинами хвиль, по-перше, дозволяє підвищити засвоюваність CO<sub>2</sub> для нарощування біомаси, по-друге, забезпечує мікроводорості світловою енергією необхідного діапазону для здійснення фотосинтетичних процесів, по-третє, дозволяє задіяти усі пігментні речовини фотосистеми, по-четверте, зменшує енергетичні витрати на освітлення. Усе це збільшує приріст біомаси мікроводоростей.
4. Світлодіоди використовуються у разі недостатнього сонячного випромінювання та в період темряви, що зменшує енергетичні витрати.
5. Використання ерліфтної системи дозволяє покращити доступ поживних речовин до клітин та не завдає їм шкоди.
6. Використання опромінення ультразвуком низької частоти дозволяє змінити метаболізм клітин та підвищити біосинтез триацилгліцеролів – сировини для отримання біодизельного палива. При цьому збільшується доля насичених жирних кислот, що підвищує параметри біодизельного палива.
7. При роботі установки були відсутні впливи на навколишнє середовище: тверді відходи використовували як домішку до харчового раціону птахів, культуральне середовище використовували як рідину для напою птахів та добриво для рослин. Також відсутні аерозольні викиди, негативні естетичні враження.
8. Одержання біодизельного пального з водоростей не вимагає використання складних технологій та устаткування.
9. Запропонована система культивування мікроводоростей забезпечує стабільний вихід біомаси водоростей з одночасним виробництвом біодизельного пального, високоякісної добавки до харчового раціону птахів та добрива.

Головний інженер  
ТОВ «Авангард»



Бадрак В.П.

Професор кафедри екобіотехнології та  
біоенергетики НТУУ «КПІ»



Голуб Н.Б.

Аспірант кафедри екобіотехнології та  
біоенергетики НТУУ «КПІ»



Левтун І.І.

## Додаток Б

Вибір обладнання та розрахунок собівартості біодизельного палива з мікроводоростей.



## 1 Розрахунок потужності виробництва

За вихідними даними за добу на виробництві планується отримувати 1000 кг біодизельного палива. Для стандартної технології одержання біодизелю з ліпідів «ТЕКМАШ» коефіцієнт перерахунку ліпідів на метилові естери жирних кислот складає 95%. Кількість ліпідів, що необхідна для виробництва такої кількості біодизелю:

$$m_{\text{ліп}} = \frac{m_{\text{бд}}}{w_{\text{ліп} \rightarrow \text{бд}}} = \frac{1000}{0,95} = 1053 \text{ кг}, \quad (\text{Б.1})$$

де  $m_{\text{ліп}}$  – маса ліпідної фракції, кг;  $m_{\text{бд}}$  – маса біодизелю яку необхідно одержати, кг;  $w_{\text{ліп} \rightarrow \text{бд}}$  – відсоток переходу ліпідів до естерів.

За запропонованою технологією культивування вміст ліпідів складає 55%. Тому кількість біомаси, яку необхідно наростити складає:

$$m_{\text{бм}} = \frac{m_{\text{ліп}}}{w_{\text{бм} \rightarrow \text{ліп}}} = \frac{1053}{0,55} = 1913,9 \text{ кг}, \quad (\text{Б.2})$$

де  $m_{\text{бм}}$  – суха біомаса мікродоростей, кг;  $m_{\text{ліп}}$  – маса ліпідів, яку необхідно одержати, кг;  $w_{\text{бм} \rightarrow \text{ліп}}$  – вміст ліпідів у біомасі *Chlorella vulgaris*.

При культивуванні після досягнення експонентної фази росту за добу отримуємо 4,8 кг/м<sup>3</sup> сухої маси мікродоростей. При відбиранні 80% культурального середовища можна отримати 4 кг/м<sup>3</sup> біомаси без зниження швидкості приросту культури.

Об'єм одного реактора при виготовленні зі стандартних частин буде рівний об'єму циліндра. При використанні стандартних частин для виготовлення реактора обрано акрилову трубу діаметром 300 мм і довжиною 2000 мм:

$$V_{\text{фбр}} = \pi \cdot r^2 \cdot l = 3,14 \cdot 0,15^2 \cdot 3 = 0,212 \text{ м}^3, \quad (\text{Б.3})$$

де  $V_{фбр}$  – об'єм реактора,  $\text{м}^3$ ;  $l$  – довжина труби,  $\text{м}$ ;  $r$  – радіус труби,  $\text{м}$ .

Об'єм кришки і днища складає 30% об'єму реактора, їх об'ємом можна знехтувати оскільки 30% відповідає вимогам до коефіцієнта заповнення.

Загальний об'єм виробництва складає:

$$V_{заг} = \frac{m_{бм}}{C_{бм}} = \frac{1913,9}{4} = 478,5 \text{ м}^3, \quad (\text{Б.4})$$

Кількість реакторів для виробництва 1000 кг/добу біодизелю складатиме:

$$N = \frac{V_{заг}}{V_{фбр}} = 2257 \text{ шт}, \quad (\text{Б.5})$$

Для перемішування культурального середовища в реакторі встановлено систему ерліфту. Подача повітря встановлюється на рівні 1  $\text{дм}^3/\text{хв}$ . Барботування проводиться протягом 24 годин. Загальна швидкість пропускання повітря ( $Q_{бн}$ ) складає:

$$Q_{бн} = N \cdot 1 \cdot 60 \cdot 24 = 135420 \text{ дм}^3/\text{добу}, \quad (\text{Б.6})$$

Вміст вуглекислого газу для оптимальної швидкості нарощування має складати 10% від об'єму барботажного повітря, що вводиться періодично [1].

Маса  $\text{CO}_2$ , що використовується складає 3508 кг/добу.

Загальний об'єм культурального середовища відповідає об'єму всіх реакторів і складає 478,5  $\text{м}^3$ .

## 2 Розрахунок собівартості біодизельного палива

Обираємо безперервний режим роботи підприємства, визначаємо загальну заплановану потужність:

$$\text{ПП} = \frac{M}{T} \quad (\text{Б.7})$$

де ПП – проектна продуктивність праці підприємства, кг/добу; M – загальна запланована потужність підприємства, кг/рік; T – тривалість календарного року, днів [1].

Загальна потужність:

$$M = \text{ПП} \cdot T = 1000 \cdot 365 = 365000 \text{ кг/рік},$$

Режим роботи підприємства – безперервний (підприємство працює 365 днів на рік протягом 24 годин на добу, двозмінний режим роботи). Тому ефективний фонд робочого часу становить:

$$T_{\text{еф}} = 365 \cdot 24 = 8760 \text{ год/рік}. \quad (\text{Б.8})$$

Система планово-попереджувальних ремонтів (ППР) містить капітальні, середні та поточні ремонти, передбачає технічний огляд та інші види міжремонтного обслуговування технологічного обладнання.

Виходячи з паспортних даних обраного обладнання розраховуємо час роботи обладнання між ремонтами, час простою, кількість ремонтів та складемо графік ППР.

В умовах безперервного виробництва номінальний річний фонд робочого часу роботи обладнання становить 8760 год/рік (або 8640 год/рік з урахуванням можливого простою обладнання з непередбачених причин, який у системі ППР складає 120 год/рік) [2].

В умовах безперервного виробництва кількість капітальних ремонтів розраховується:

$$n_k = \frac{8640}{a_k}, \quad (\text{Б.9})$$

де  $a_k$  – час між двома капітальними ремонтами.

Кількість середніх ремонтів:

$$n_c = \left( \frac{8640}{a_c} \right) - n_k, \quad (\text{Б.10})$$

де  $a_c$  – час між двома середніми ремонтами.

Кількість поточних ремонтів:

$$n_p = \left( \frac{8640}{a_p} \right) - n_k - n_c, \quad (\text{Б.11})$$

де  $a_p$  – час між двома поточними ремонтами.

Загальний час простою у ремонтах визначають за формулою:

$$T_{\text{рем}} = n_k \cdot t_k + n_c \cdot t_c + n_p \cdot t_p, \quad (\text{Б.12})$$

де  $n_k, n_c, n_p$  – кількість відповідних ремонтів, од.;  $t_k, t_c, t_p$  – запланований час простою обладнання в ремонті, год./од.

Для обладнання, в умовах безперервного виробництва, кількість капітальних ремонтів дорівнює за рік:

$$n_k = \frac{8640}{8640} = 1.$$

Кількість середніх ремонтів:

$$n_c = \frac{8640}{1440} - 1 = 5.$$

Кількість поточних ремонтів:

$$n_{\Pi} = \frac{8640}{720} - 1 - 5 = 6.$$

Загальний час простою у ремонтах:

$$T_{\text{рем}} = 1 \cdot 96 + 5 \cdot 10 + 6 \cdot 3 = 164 \text{ год.}$$

Ефективний час роботи підприємства:

$$T_{\text{еф}} = 8760 - 120 - 164 = 8476 \text{ год.}$$

Розрахунки проводимо для кожного найменування одиниці обладнання.

Для фотобіореактора згідно паспортних даних планується проведення капітального ремонту 1 раз на 6 років; проведення середніх ремонтів – один раз на 2 роки; проведення поточних ремонтів – два рази на рік.

Основні техніко-економічні показники виробництва представлені у табл. Б.1.

Таблица Б.1

### Техніко-економічні показники виробництва біодизелю

Показник	Значення показників підприємства	
	Одиниця вимірювання	Значення
1. Річний випуск продукції;	кг/рік	365 000
2. Чисельність персоналу по списках У тому числі:	осіб	8
• основні й допоміжні робітники;		4
• інженерно-технічні робітники;		4
3. Середньорічний виробіток робітника;	грн./особу	620 499,99
4. Капіталовкладення • усього;	грн.	55 531 094,38
5. Загальна собівартість продукту:	грн.	15 935 790

• усього;	грн./кг	14,5
• на одиницю продукції (біодизель);	грн./кг	38
• на одиницю продукції (жом);	грн./кг	40
• на одиницю продукції (гліцерол);		

## Продовження табл. Д.1

6. Ринкова вартість продукту (біодизель);	грн./дм <sup>3</sup>	22
7. Відносний прибуток на одиницю продукції;	грн./дм <sup>3</sup>	7,5
8. Рентабельність продукту;	%	152
9. Строк повернень капіталовкладень;	років	5
10. Вартість виробничих фондів У тому числі: - основних; - оборотних;	грн.	45 098 131,88 1 181 406,25
11. Фондовіддача виробничих фондів (за біодизелем);	грн./грн.	0,996
12. Фондомісткість (за біодизелем);	грн./грн.	1,004
13. Продуктивність праці підрозділу (за біодизелем);	грн./особу	661 562,5
14. Коефіцієнт економічної ефективності	-	0,87

У табл. Б.2 наведено розрахунок вартості та монтажу обладнання

Таблиця Б.2

Розрахунок вартості придбання нового обладнання

Обладнання	Витрати електроенергії, кВт/год	Всього витрат, кВт/добу	К-ть, шт	Ціна за все, грн.
Воздухозабірник			1	322
Фільтр грубої очистки			1	2 200
Фільтр тонкої очистки			1	3 000
Повітродувка	1,0125	48,6	2	60 000
Балон вуглекислоти	0,2	4800	500	1 000 000
Установка зворотнього осмосу	6,25	150	1	31 980
Змішувачі культурального середовища	0,006	0,28	2	16 000

Шнекові дозатори	0,0025	0,84	14	49 000
Автоклав	0,111	69,3	26	3 900 000
Змішувачі для розчинів метоксиду і кислоти	1,5625	75	2	16 000

## Продовження табл. Б.2

Дозаторы жидкостные	0,00125	0,06	2	3 000
Насоси рідинні	0,83	132	3	60 000
Фотобіореактор		0	2 257	15 000 000
Світлодіодні світильники	0,000625	45	2 257	23 208 990
Ультразвукові генератори	0,0007083	17	2 257	300 000
Рідинний насос дозатор	0,0000025	0.06	2 257	1000
Збірник		0	2 257	855 000
Ультразвукові випромінювачі	0,010020548	240,49	2 257	100 000
Прес-фільтр	0,25	6	1	28 950
Сушка	0,407248858	9.77	1	20 000
Шнековий прес	4,375	105	1	31 800
Установка «ТЕКМАШ»	0,9167	22	1	33 000
КВПіА	0,2083	5	1	5 000
<b>ВСЬОГО</b>		<b>6 374 44</b>	<b>-</b>	<b>44 764 014</b>

У табл. Б.3 наведено розрахунок амортизаційних відрахувань.

Розрахунок витрат сировини, матеріалів базується на нормах витрат, встановлених галузевими нормативами, стандартами та технологічними регламентами підприємств, обраним технологічним рішенням. Результати розрахунку представлені в табл. Б.4.

Амортизація розрахована за нормою у 5% з розрахунку на строк експлуатації 20 років.

Таблиця Б.3

**Розрахунок суми на амортизаційні відрахування**

Амортизація						
	од.	1 рік	2 рік	3 рік	4 рік	5 рік
Початкова вартість	грн.	37,302,511.7	37,302,511.7	37,302,511.7	37,302,511.7	37,302,511.7
Обладнання	грн.	37,302,511.7	37,302,511.7	37,302,511.7	37,302,511.7	37,302,511.7
Амортизація	грн.	1,709,698.5	1,865,125.6	1,865,125.6	1,865,125.6	1,865,125.6

Обладнання	грн.	1,709,698.5	1,865,125.6	1,865,125.6	1,865,125.6	1,865,125.6
Залишкова вартість	грн.	35,592,813.2	33,727,687.6	31,862,562.0	29,997,436.5	28,132,310.9
Обладнання	грн.	35,592,813.2	33,727,687.6	31,862,562.0	29,997,436.5	28,132,310.9
Накопичена амортизація	грн.	1,709,698.5	3,574,824.0	5,439,949.6	7,305,075.2	9,170,200.8
Обладнання	грн.	1,709,698.5	3,574,824.0	5,439,949.6	7,305,075.2	9,170,200.8

Таблиця Б.4

### Розрахунок вартості сировини та матеріалів

Сировина та матеріали, грн..	Витрати на рік		Витрати на одиницю продукції		
	Кількість, од.	Сума, грн..	Кількість, од.	Ціна, грн./м <sup>3</sup>	Сума, грн..
Культуральне середовище (4 рази ре-цикл)	174652, 5 м <sup>3</sup>	3056418,75	0,119625 м <sup>3</sup>	70 грн./м <sup>3</sup>	33
Метанол	6621,6 м <sup>3</sup>	754862,4	0,018 м <sup>3</sup>	114 грн./м <sup>3</sup>	2,05
Гідроксид калію	7543 кг	377150	0,02 кг	50 грн./кг	1
Вуглекислота	137640 кг	2752800	0,377 кг	20 грн./кг	7,54

Заплановану до споживання кількість електроенергії розраховуємо за формулою:

$$E_{\phi} = \frac{M_{\Pi} \cdot T_{\text{еф}} \cdot K_{\text{зб}}}{K_{\text{поп}}}, \quad (\text{Б.13})$$

де  $M_{\Pi}$  – установлена максимальна потужність одиниці обладнання, кВт/год;  
 $T_{\text{еф}}$  – ефективний час роботи обладнання, год;  $K_{\text{зб}}$  – коефіцієнт збільшення потужності обладнання;  $K_{\text{поп}}$  – коефіцієнт попиту на електроенергію.

Розраховані величини для основного обладнання наведено у табл. Б.5.

Вартість спожитої енергії розраховуємо за формулою:

$$T_e = E \cdot C, \quad (\text{Б.14})$$

де  $C$  – ринкова вартість електроенергії.

$$T_e = 637444 \cdot 2 = 1274888 \text{ грн/добу}$$



Таблиця Б.5

**Вартість енерговитрат та води**

Енергоносії	Витрати на рік		Витрати на кг мікродоростей		
	Кількість, од.	Сума, грн.	Кількість, од	Ціна, грн./од.	Сума, грн.
Електроенергія	637444 кВт	1274888	1,75 кВт	2	3,5
Вода (входить в вартість середовища і електроенергії)	174652, 5 м <sup>3</sup>	1903712,25	0,4785 м <sup>3</sup>	10,9	5,22
Всього		1274888			3,5

До собівартості продукції входить вартість основних виробничих фондів підприємства, оборотні кошти та оборотні фонди, а також опосередковані витрати (вартість утримання адміністративно-управлінського персоналу та інші витрати, які неможливо безпосередньо віднести на собівартість готової продукції).

Приблизний розрахунок собівартості продукції (кг біодизелю, що одержано за використання мікродоростей) наведено в табл. Б.6.

Таблиця Б.6

**Собівартість кг біодизелю**

Стаття калькуляції	Витрати на річне одержання біодизелю та побічних продуктів, грн.	Витрати на кг біодизелю, грн.
Сировина та матеріали	6 941 231,15	0,08* (0,0256)
Енерговитрати	1274888	0,81* (0,1212)
Заробітна плата робітників	384 000	1,05
Витрати на утримання та експлуатацію устаткування	2 249 125	6,1* (1,95)
Цехові витрати	1 606 794,06	4,4* (1,4)
Разом цехова собівартість	14 652 112,75	40,142* (12,8)

Продовження табл. Б.6

Загальнозаводські витрати (3% цехової собівартості)	19 304,83	0,053* (0,017)
Виробнича собівартість	14 671 417,27	40,196* (12,86)
Позавиробничі витрати (3% виробничої собівартості)	440 142,62	1,2* (0,384)
Повна собівартість	15 935 790	44,5* (14,5)

\* Без врахування продажу побічних продуктів

Отже, орієнтовна собівартість 1 кг біодизелю, враховуючи побічні продукти становить 14,5 грн.

#### Використані джерела

1. Soldatini G.F. Sulfite: Preferential sulfur source and modifier of CO<sub>2</sub> fixation in *Chlorella vulgaris* / G.F. Soldatini, I. Ziegler, H. Ziegler // *Planta*. – 1978. – vol. 143. – № 2. – P. 225–231.

2. Підлісна О.А. Методичні вказівки до виконання організаційно-економічної частини дипломних проектів для студ. хіміко-технологічних спец. усіх форм навчання. / О.А. Підлісна, В.В. Янковий, М.П. Дорошенко // – К.: ІВЦ «Видавництво «Політехніка». – 2002. – 28 с.