

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ

«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ  
ІМЕНІ ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра екобіотехнології та біоенергетики

«На правах рукопису»  
УДК \_\_\_\_\_

«До захисту допущено»

В.о. завідувача кафедри  
\_\_\_\_\_ Кузьмінський Є.В.

“ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2021р.

## Магістерська дисертація

на здобуття ступеня магістра

за освітньо-науковою програмою «Біотехнології»

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»,  
(код і назва)

на тему: «Вплив умов подачі CO<sub>2</sub> на приріст біомаси *Chlorella vulgaris*.»

Виконала: студентка 6 курсу, групи БЕ-91мн

(шифр групи)

Астахова Владислава Ігорівна  
(прізвище, ім'я, по батькові)

(підпис)

Науковий керівник: асистент кафедри, к.т.н. Левтун І.І.

(підпис)

Консультант: Економічна частина, доцент, к.е.н. Ткаченко Т.П.

(підпис)

Рецензент \_\_\_\_\_

(посада, науковий ступінь, вчене звання, науковий ступінь, прізвище та ініціали)

(підпис)

Засвідчую, що у цій магістерській  
дисертації немає запозичень з праць інших  
авторів без відповідних посилань.

Студент \_\_\_\_\_

(підпис)

Київ – 2021 року

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	6
1.1. Характеристика <i>Chlorella vulgaris</i> .....	6
1.1.1. Місце в систематиці та поширення.....	6
1.1.2. Морфологія.....	10
1.1.3. Репродукція .....	13
1.1.4. Хімічний склад.....	17
1.1.5. Застосування.....	22
1.1.6. Фактори, які впливають на життєдіяльність <i>Chlorella vulgaris</i> .....	28
1.1.6.1 Вплив температури.....	28
1.1.6.2 Вплив рН.....	30
1.1.6.3 Вплив поживного середовища: макро- та мікроелементи.....	30
1.1.6.4. Вплив освітленості.....	42
1.1.7 Типи фотобіореакторів для вирощування <i>Chlorella vulgaris</i> .....	47
Висновки до підрозділу.....	52
1.2. Роль вуглекислого газу в життєдіяльності клітин <i>Chlorella vulgaris</i> .....	53
1.2.1. Розчинність CO <sub>2</sub> у середовищі.....	53
1.2.2. Аналіз досліджень впливу CO <sub>2</sub> на приріст біомаси зелених мікроводоростей.....	58
Висновки до розділу .....	67

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ КУЛЬТИВУВАННЯ <i>CHLORELLA VULGARIS</i> .....	68
Висновки ло розділу 2.....	74
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ .....	75
3.1 Культивування <i>Chlorella vulgaris</i> в фотобіореакторах ерліфтного типу	
3.2. Вплив діаметру дифузора на тривалість лаг-фази при культивуванні біомаси <i>Chlorella vulgaris</i> при зміні поживного середовища	
РОЗДІЛ 4. ЕКОНОМІЧНА ЧАСТИНА:РОЗРОБЛЕННЯ СТАРТАП- ПРОЄКТУ.....	90
4.1. Резюме: конкретизація бізнес-ідеї, мети стартапу, об'єкту дослідження, місця розробки у інноваційному ланцюжку цінності.....	90
4.2. Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища стартапу.....	96
4.3. Визначення ключових факторів успіху проекту .....	100
4.4. Визначення потенційних споживачів.....	104
4.5. Ціна інноваційної пропозиції на ринку.....	105
4.6. Концепцію бізнес-моделі проекту та карта бізнес-процесів реалізації проекту.....	107
4.7. Ризики розробки та методи управління ними.....	109
РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ОХОРОНА ДІВКІЛЛЯ.....	112
ВИСНОВКИ .....	119
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	121

## ВСТУП

Інтерес до вирощування мікродоростей для пом'якшення викидів CO<sub>2</sub> отримав перевагу при проведенні досліджень, головним чином завдяки високій швидкості фотосинтезу, який дозволяє їм біофіксувати CO<sub>2</sub> більш ефективно, ніж наземні культури. Саме тому це дозволило поставити проблему та дослідити її можливе вирішення у даній роботі.

**Постановка проблеми:** За підрахунками Бельбута та Перейри, підрахунок викидів CO<sub>2</sub> збільшиться з 36,131 млн. тонн у 2013 р. до майже 51,883 млн. тонн у 2100 р., і це приблизно на 52,9% вище рівня 2010 року. Однак деякі інші прогнози є більш песимістичними (наприклад, за оцінками OECD, викиди CO<sub>2</sub> у 2050 році будуть на 70% вище, ніж у 2010 р. [1].

Враховуючи дане дослідження, при умовах постійно зростаючих цін на традиційні види палива та постійне зменшення кількості їх запасів, у світі проявляється енергетична криза. Основною тенденцією паливного ринку міжнародними експертами заявлена саме біоенергетика, що повинна стати початком нової ери енергетики для вирішення даної проблеми. Мікродорості, які використовуються в цьому дослідженні буи представники виду *Chlorella vulgaris*. М'яо і Ву (2006) повідомили, що гетеротрофний ріст хлорели забезпечив можливість отримати вміст ліпідів 55-75% , що в подальшому може перетворитись на біодизель [2].

В денний час мікродорості поглинають більше 80% викидів CO<sub>2</sub> від електростанцій і можуть використовуватися для отримання до 10 000 галонів рідкого палива на акр в рік [2]. Тому є необхідним дослідити вплив CO<sub>2</sub> на отримання біомаси, аби розглянути варіант майбутньої інтеграції виробництва з промисловими галузями готового виробництва.

Тому **метою** цього дослідження є вивчення впливу CO<sub>2</sub> на приріст біомаси та утворення ліпідів *Chlorella vulgaris* на середовищі Громова 6.

**Очікувані результати:**

Очікується, що дослідження допоможе визначити раціональний діаметр дифузора для подачі барботажного повітря, насиченого CO<sub>2</sub>, для перемішування біомаси та підтримки її життєдіяльності; характеризувати порівняння темпів зростання та ліпідної продукції *Chlorella vulgaris* при раціональній кількості поживних речовин і світла для культивування.

### **Актуальність.**

Використання мікроводоростей, як сировини, для отримання біодизелю, дозволяє уникнути проблеми конкуренції з сільськогосподарською промисловістю (у випадку з використанням соняшника, рапса, тощо в якості сировини для отримання олії). Дослідження впливу CO<sub>2</sub> на приріст біомаси та продукування ліпідів дозволить створити уявлення про раціональні умови барботування при промисловому виробництві, а також отримання раціональних розмірів дифузора з точки зору технічних характеристик виробництва та його попередньої оцінки вартості.

**Задача роботи** – провести порівняльне дослідження культивування водорості *Chlorella vulgaris* за різних умов барботування, що являють собою різні діаметри дифузора. Визначити раціональні розміри дифузора за допомогою величин приросту біомаси.

**Об'єкт дослідження.** Процес культивування мікроводоростей в лабораторному біореакторі ерліфтного типу з різними діаметрами дифузора з подачею атмосферного повітря.

**Предмет дослідження.** Процес розчинення CO<sub>2</sub> у середовищі Громова 6 та вплив цього процесу на приріст біомаси *Chlorella vulgaris*.

**Новизна роботи.** Вперше визначено раціональні розміри дифузора для барботування при культивуванні мікроводорості *Chlorella vulgaris* з метою отримання найбільшого приросту біомаси.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Характеристика *Chlorella vulgaris*

#### 1.1.1. Місце в систематиці та поширення

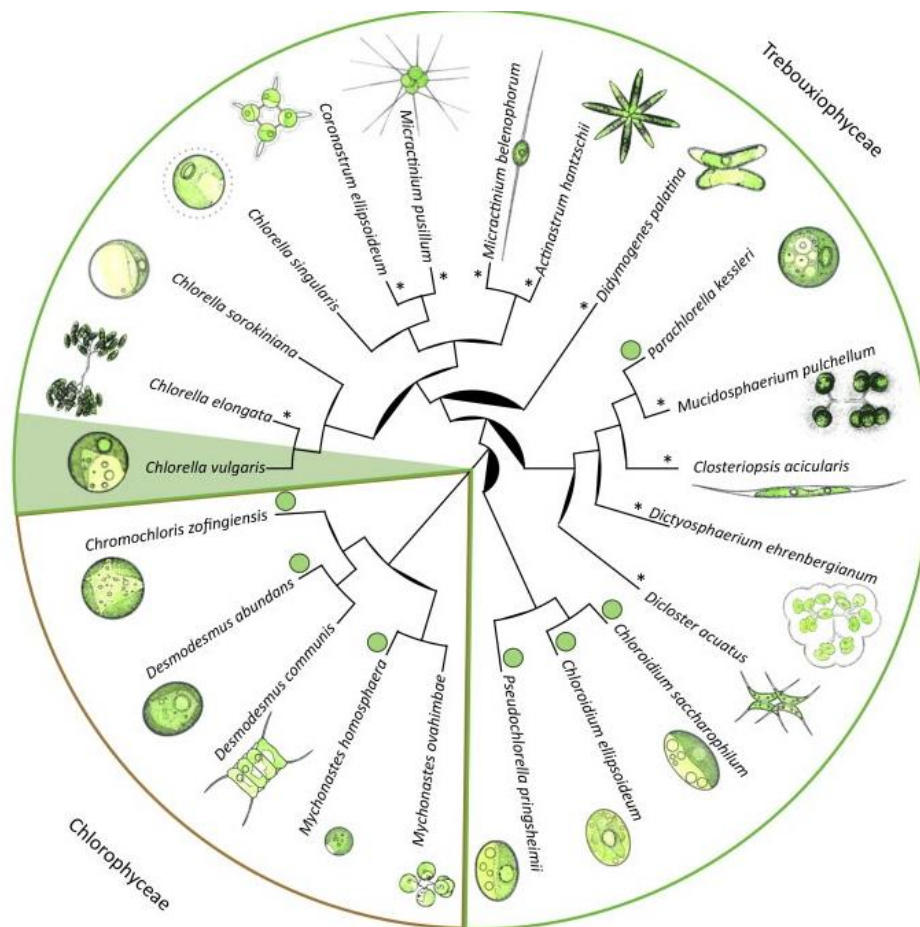
Зелені мікро-водорості *Chlorella vulgaris* відносяться до наукової класифікації:

домен *Eukaryota* → царство *Protista* → відділ *Chlorophyta* → порядок *Chlorellales* → родина *Chlorellaceae* → рід *Chlorella* → вид *Chlorella vulgaris* [2].

*Chlorella vulgaris* є невибагливою до умов навколишнього середовища і може досить швидко ділитися, тому дуже широко розповсюджена і зустрічається практично всюди. У водоймах *Chlorella vulga* є типовою планктонною водорістю, але зустрічається вона як бентосі, так і на наземних субстратах і в ґрунті [3].

За понад 125 років після відкриття *Chlorella* багато зелених та кокоподібних клітин були помилково описані як частина одного роду. Вони є відносно загальною клітиною, особливо при порівнянні видів лише за допомогою світлового мікроскопа. З поступовим розвитком послідовностей ДНК та розвитком біоінформатики було встановлено, що багато клітин, які населяють клас *Trebouxiophyceae*, були неправильно охарактеризовані як різні морфи *Chlorella*, що було помилоковим. Ця закономірність мала і оборотню сторону: було виявлено 7 нових видів, що належать до роду *Chlorella*, а раніше вони були неправильно визначені як окремі еволюційні лінії. При дослідженнях цілих геномів, еволюційна відстань між зеленими водоростями, такими як *Chlorella* та наземними рослинами, є ближчою, ніж відстань між *Chlorella* та зеленими та бурими водоростями. Кодуючі білок гени рецепторів та ферментів, які взаємодіють із наземними хімічними речовинами, такими як ауксин, що є важливим для згинання рослинного листя та стебел до світла) та цитокінін свідчать про те, що еволюційний предок рослин і зелених водоростей поділяв ці риси ще раніше за рослин. (Рис.1) [3]

Рис.1. Місце *Chlorella vulgaris* серед зелених мікроводоростей. [3]



*Chlorella vulgaris* є широко поширеною в природі і її різні види, яких налічується приблизно 30 зустрічаються в річках, в дрібних водоймах або в прибережній зоні великих водойм, в ґрунті, а також в мінеральних джерелах різного складу. [3] Мешкаючи в різноманітних умовах, дані водорості мають добру пристосовність до мінливих умов середовища і характеризуються великою витривалістю. Зокрема, вони здатні переносити сильне висушування і охолодження до декількох градусів. Серед них є як термофільні форми, для яких температурний оптимум життєдіяльності знаходиться в межах 35-40 °С; так і мезофільні форми, для яких оптимум відповідає 22-27 °С; ще є низькотемпературні форми, де оптимум становить 10-15°С.

Для сталого росту і розвитку водорості необхідні вода, сонячне світло, вуглекислий газ та мінеральні речовини. У дуже змінних умовах середовища водорості знижують свій приріст біомаси та розвиток клітин. У найбільш

складних умовах, наприклад, у зимовий час, вони переходять у спокійний стан, виявляють сезонну періодичність активності [4].

Клітини мікродорості *Chlorella vulgaris* - поодинокі, сферичної або еліпсоїдної форми, діаметр різних видів може коливатися в межах 1,5-15,0 мкм. Клітина покрита щільною гладкою (що містить хітин) целюлозною оболонкою. У протопласті молодих клітин є ядро та чашоподібний хроматофор з великим періноїдом. Ядро містить галоїдний набір хромосом. У цитоплазмі клітини відбувається накопичення запасних речовин таких як крохмаль та жири. У пластидах мікродорості містяться хлорофіли форм *a* і *b*, що акумулюють енергію сонячного світла для подальшого утворення органічних речовин. Одна клітина виконує усі життєві функції [5].

За виникненням стресових чинників, змінам спочатку піддається фотосинтетичний апарат клітин (Buchanam et al., 2015) [5]. Особливий інтерес для вивчення останній час викликає адаптивна роль фотосинтетичних пігментів, а саме - хлорофілів *a*, *b*, феофітинів та каротиноїдів (Sun et al., 2014) [6]. Зміни, які викликають екстремальні стани у клітині, індукують утворення вторинної клітинної стінки, яка є структурою, виявленою у багатьох клітинах рослин, розташованою між першою стінкою клітин і плазматичною мембраною (Buchanam et al., 2015). Було встановлено формування такої стінки, що назвали «феноменом» утворення так званих подвійних концентричних мембран (Grubinko and Kostyuk, 2012) [6], за дії йонів цинку при досягненні критичних рівнів його накопичення. При цьому з пулу метаболітів вилучаються необхідні сполуки для зв'язування токсикантів, що також вимагає посилення процесів біосинтезу (Gorda and Grubinko, 2011). Дослідження змін, що відбуваються у фотосинтетичному апараті *Chorella vulgaris* Beij. – це один із важливих етапів комплексного оцінювання впливу селеніту натрію та іонів металів на водорості. (Табл.1) [6]



Табл.1. Вміст пігментів *Chorella vulgaris* протягом 7 днів культивування.

Хлорофіл <i>a</i> , мкг/дм <sup>3</sup>	Хлорофіл <i>b</i> , мкг/дм <sup>3</sup>	Співвідношення хлорофілів <i>a/b</i>	Пігментний індекс: <u>сума каротиноїдів</u> / хлорофіл <i>a</i>
142,2 ± 19,0	60,6 ± 5,2	2,35	0,33
193,1 ± 12,2	90,1 ± 9,7	2,14	0,33
189,6 ± 10,0	118,0 ± 3,4*	1,61	0,37
252,2 ± 8,1*	185,5 ± 16,2*	1,36	0,32
295,6 ± 9,9*	239,5 ± 9,1*	1,23	0,25
280,0 ± 10,6*	229,8 ± 2,5*	1,22	0,27
257,2 ± 20,3*	243,7 ± 5,7*	1,06	0,28

Статеве розмноження в мікрководорості є невідомим та не визначеним. Розмножується водорість автоспорами, що виходять з материнської клітини через розрив своєї оболонки. Материнська клітина, в залежності від числа поділів, які відбуваються у взаємно перпендикулярних напрямках, утворює в нормі таке число автоспор, що є кратним двом (2,4,8,16 і т.д.).

Зазвичай, автоспори, які утворилися в одній материнській клітині, є еквівалентними один одному як морфологічно, так і фізіологічно. Число автоспор, на яке ділиться материнська клітина в даних умовах розвитку, є досить постійним. Але завжди є фракція, яка відхиляється від модального числа автоспор.

Період розвитку клітини від молодого автоспори до виходу дочірніх автоспор - це життєвий цикл.

Автоспори - це невеликі клітини (2,0-2,5 мкм) з відтягнутою клітинною оболонкою і хлоропластом еліпсоїдної форми з точковим періноїдом. Автоспори спершу починають свій розвиток (перша фаза - зростання), коли хлоропласт, зберігаючи довгасту форму, трохи збільшується і заповнює весь простір під клітинною оболонкою. Кінець цієї фази настає, коли спостерігається інтенсивне збільшення розмірів періноїда, форма клітини стає округлою.

У дорослій клітині (друга фаза - дозрівання) починається збільшення розмірів клітинної оболонки і хлоропласта, який поступово набуває чашоподібну форму. До кінця фази досягаючи максимальних розмірів

хлоропласт знову заповнює практично весь обсяг клітини. Після того як клітина досягла свого максимального розміру збільшення припиняється і в ній відбуваються структурні зміни перед початком утворення дочірніх клітин.

Дозрівання характеризується тим, що хлоропласт, що розрісся набуває неправильну форму, периноїд поступово зникає і клітина переходить до поділу, формування дочірніх клітин.

Розподіл (остання фаза) відбувається послідовно до утворення максимально можливого в даних умовах числа автоспор. По закінченню формування дочірніх клітин відбувається розрив оболонки материнської клітини, після чого звільнилися автоспори викидаються назовні.

Після виходу автоспор культура повертається в нульову фазу і цикл розвитку починається спочатку. Розподіл часу за фазами приблизно наступний: перша фаза - 3 години; друга фаза - 4 години; третя фаза - 1 година; четверта фаза - 1 година; нульова фаза - 3 години. Незважаючи на те, що весь процес виходу автоспор з оболонок в культурі займає близько 3 годин, інтенсивний вихід відбувається за більш короткий період (близько півгодини). Автоспори, що вийшли, відразу ж починають розвиватися [6].

Мікродорості відрізняється високою ефективністю фотосинтезу: тоді як більшість вищих рослин здатіє вловлювати до 3% сонячного світла, *Chlorella vulgaris* може використовувати більше 70% сонячного світла, при цьому 1 кг біомаси водорості виділяє в добу до 270 л кисню [7].

### **1.1.2. Морфологія.**

Молоді клітини *C. vulgaris* еліпсоїдної форми, розміром від 1.5 до 2.0 мкм, зрілі - шароподібні, діаметром 6–9 мкм. Зовні клітини вкриті твердою двоконтурною оболонкою целюлозної природи, яка забезпечує цілісність клітини і захист від паразитів і умов навколишнього середовища. Клітинна оболонка змінює свій хімічний склад і товщину відповідно до кожної фази росту та умов навколишнього середовища. Жорсткість клітинної стінки

обумовлена хітозаноподібним шаром, що складається з глюкозаміну. Крім того, деякі дослідження пояснюють жорсткість клітинної стінки присутністю спорополеніну - надзвичайно стійкого полімеризованого каротиноїда, який входить до складу клітинних стінок спор та пилок вищих рослин [8, 9].

Рис.2. Мікроскопічні зображення клітини *Chlorella vulgaris* [9].



*C. vulgaris* містить такі органели, як ядро, мітохондрії, вакуолі, один хлоропласт і тільця Гольджі. Клітини одноядерні, містять лише одну мітохондрію; розмір ядра близько 1 мкм. Цитоплазма пронизана системою розгалужених каналців ендоплазматичного ретикулума, які в деяких місцях розширюючись, утворюють цистерни чи пухирці з мембраною, яка несе рибосоми. Всередині 12 клітин *C. vulgaris* містяться мікротрубочки, їх кількість та локалізація непостійна, і залежить від функціонального стану клітини. Мікротрубочки з'являються перед каріокінезом, а зникають по завершенню цитокінезу. Також в клітинах присутні пероксисоми, що містять фермент гліколатдегідрогеназу, що бере участь у процесі фотодихання [10].

Хлоропласт оточений подвійною мембраною; зовнішня мембрана проникна для метаболітів та іонів, внутрішня мембрана має більш специфічну функцію, пов'язану з транспортом білків. Забарвлення хлоропласту може мати різноманітні відтінки зеленого кольору, які зумовлені присутністю і різним співвідношенням хлорофілів *a* і *b*,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\epsilon$ -каротинів, а також ксантофілів, лютеїну, віолаксантину, неоксантину, зеаксантину, антераксантину.

Несприятливі умови можуть призводити до суттєвих змін співвідношення компонентного складу пігментів у напрямку переважання каротиноїдів [11].

Піреноїд містить значну кількість рибулозо-1.5-бісфосфат-карбоксилази і є центром фіксації вуглекислоти. Крохмальні зерна можуть утворюватися всередині хлоропласту навкруги піреноїда та в стромі, особливо при несприятливих умовах росту [10].

Хлорела добре пристосовується до умов навколишнього середовища. Вона може витримувати короточасні впливи крайніх (1 та 12) значень рН середовища, різкі зміни концентрації та коливання температури [11].

Мікроводорість *Chlorella vulgaris* – мікроскопічний одноклітинний Фотосинтезуючі мікроорганізм; має сферичну форму, близько 2-10 мкм в діаметрі. Як і у всіх вищих рослин, в пластидах *Chlorella vulgaris* містяться хлорофіли форм а і b, функція яких полягає в акумулюванні енергії сонячного світла і використанні її для утворення органічних речовин.

*Chlorella vulgaris* широко поширена в прісних водах, на сирій землі, корі дерев і т.д. Це одноклітинна зелена водорість без джгутиків, вічок і скорочувальних вакуолей має округлу форму і за розмірами менше хламідомонади. Клітини містять зазвичай чашоподібний хлоропласт з піреноїдом або без нього і одне дрібне ядро.

Єдиний спосіб розмноження - безстатевий, причому кожна гаплоїда клітина мітотично ділиться двічі або тричі з утворенням відповідно чотирьох або восьми нащадків - автоспор, які ще всередині оболонки материнської клітини покриваються власними оболонками. Звільняються автоспори після розриву стінки материнської клітини [12].

Процес розмноження *Chlorella vulgaris* вельми інтенсивний. За оптимальних умов за короткий час можна отримати приріст біомаси в 200 разів більший, ніж у вищих рослин [12].

Застосування *Chlorella vulgaris* ґрунтується на дуже високому вмісті у ній біологічно-цінних речовин. Суха біомаса *Chlorella vulgaris* може містити більше 45% сирого протеїну, включаючи незамінні амінокислоти, 30...35% вуглеводів, 7...10% жиру. У складі клітини *Chlorella vulgaris* містяться незамінні в харчуванні тварин амінокислоти: аргінін ( $\approx 15\%$ ), гістидин ( $\approx 3\%$ ), лізин ( $\approx 10\%$ ), метіонін ( $\approx 1\%$ ), триптофан ( $\approx 2\%$ ), треонін ( $\approx 2\%$ ), валін ( $\approx 5\%$ ), лейцин ( $\approx 6\%$ ), ізолейцин ( $\approx 3\%$ ), фенілаланін ( $\approx 2\%$ ), а також хлорофіл ( $\approx 2\%$ ).

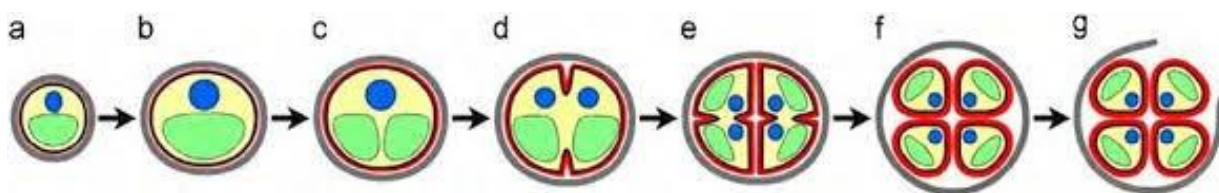
На частку вітамінів в біомасі *Chlorella vulgaris* припадають в основному вітаміни груп В, С, РР, Е, а також каротин. В диких штаммах в нативному вигляді містяться мікроелементи - йод, калій, фосфор, залізо, магній, бром, миш'як, кобальт, і тому подібні, також і антибіотики.

*Chlorella vulgaris* не є вимогливою до умов проживання і може досить інтенсивно розмножуватися, тому вона настільки широко поширена і зустрічається практично всюди. У водоймах - це типова планктонна водорість, але зустрічається вона і в бентосі, а також на наземних субстратах і в ґрунті.

### 1.1.3. Репродукція

Єдиний спосіб розмноження *C. vulgaris* - безстатевий, причому кожна гаплоїдна клітина мітотично ділиться двічі або тричі з утворенням відповідно чотирьох або восьми автоспор, які ще всередині материнської клітини покриваються власними оболонками. Після дозрівання автоспор відбувається розрив материнської клітинної стінки, дочірні клітини виходять назовні і можуть використати для живлення залишки материнської клітини (Рис.3). [12]

Рис.3. Різні фази формування дочірньої клітинної стінки у *Chlorella vulgaris*:



a) рання фаза росту клітин; (b) пізня фаза росту клітин; (c) фаза поділу хлоропласту; (d) рання фаза поділу протопластів; (e) пізня фаза поділу протопластів; (f) фаза дозрівання дочірніх клітин та (g) фаза вилуплення

Поділ клітин відбувається один раз на добу, але деякі штами хлорели в умовах інтенсивного культивування здатні до більш інтенсивного розмноження.

Процес розмноження *C. vulgaris* інтенсивний. За оптимальних умов за короткий час можна отримати приріст біомаси в 200 разів більший, ніж у вищих рослин [12].

Рухомих елементів розмноження у хлорели не існує. Аномальний характер циклу розвитку зустрічається нечасто і полягає у тому, що іноді клітини розмножуються відшнуровуванням дочірніх особин від материнської клітини.

Окрім того при нормальному поділі дочірні клітини можуть не виходити з материнської оболонки, залишаючись в ній на довгий час [12].

Одним з основних факторів, які впливають на фізіологію і кінетику зростання хлорели є світлові умови [13]. Кількість і якість світла визначають кількість енергії, доступної для фото синтезуючих організмів, для проведення їх метаболічних процесів. Численні дослідження з мікро водоростями різних груп свідчать про те, що пігменти, ненасичені жирні кислоти, вуглеводи і вміст білка змінюються у відповідь на збільшення або зменшення інтенсивності світла. Варіації в світло-темному режимі накладають зміни клітинного змісту білків, вуглеводів і ліпідів.

Одне дослідження показало, що зростання фітопланктону залежить від загальної кількості світла в день, а в інших дослідженнях встановлено, що в залежності від виду фітопланктону зростання може контролюватися тільки фотоперіодом [14]. Результати у роботі [15] на показали, що збільшення тривалості світла з 8:16 до 16:8 годин зробило сприятливий вплив на

виробництво біомаси. Дійсно, режим світло/темрява дозволяє або збільшити кінцеву концентрацію, або знизити витрати виробництва. Необхідність темної фази пояснювалася тим, що фотосинтез регулюється двома реакціями: фотохімічною фазою, що залежить від світла, і іншою - біохімічною темною фазою, яка не залежить від світла.

З'єднання, які виробляються у фазі, залежать від світла (АТФ, НАДФН), використовуються в темній фазі для синтезу метаболічних молекул, необхідних для росту. Крім того, у роботі [16] повідомили, що деякі ферменти циклу пентози фотосинтезу і фіксації CO<sub>2</sub> неактивні під час опромінення. Згідно з тією ж [17] роботою, спорідненість карбоксидзіматази до CO<sub>2</sub> різко зменшується в темряві, коли рН знижується. Її активність може бути повністю заблокована. Ця інактивація блокує поглинання рібuloза 1,5-дифосфата, таке як повне поглинання, може перешкоджати відновленню фотосинтезу на світлі. Темна фаза залишається необхідною, як мінімум, для регенерації кофакторів (НАД<sup>+</sup>, НАДФ<sup>+</sup>), необхідних для фази I фотосинтезу.

З 15/9 циклом фотоперіоду, використовуючи серію фотографій, зроблених в кожен годину дня, [18] показав, що поділ клітин відбувається в умовах недостатнього освітлення для багатьох одноклітинних *Chlorophyceae*.

Розподіл клітин відбувається в темній фазі, а також в освітленій фазі. Якщо рівновага клітин, яку дає мітоз, можлива при темних і освітлених умовах, розподіл клітин відбувається частіше після переривання освітленої фази. Тому краще використовувати фотоперіод з тривалістю світла від 12 до 15 годин, щоб забезпечити рівновагу, яка встановлюється між анаболічними і катаболічними явищами протягом циклу фотоперіоду. Крім того, для промислового застосування та обліку співвідношення витрат енергії і відповідних виробництв біомаси тривалість освітлення протягом 12-15 годин для освітленої фази зазвичай вважається оптимальною для росту водоростей [18].

Виробництво біомаси в багатьох мікроводоростей збільшувалася в умовах високої освітленості, що є очікуваною відповіддю на високе світло, що зазвичай призводить до збільшення відтворення до тих пір, поки не буде спостерігатися інтенсивність точки насичення, і після цього спостерігалася фотоінгібування, що обмежує подальше виробництво біомаси. Цей ефект викликаний реакцією фотоокислення всередині клітини, оскільки надмірне світло не може бути поглинене фотосинтетичним апаратом [19].

Освітлення складається з двох предметів: інтенсивності та довжини хвилі світла. Наявні дані свідчать про те, що світло діє як орієнтир і допомагає впливати на проліферацію клітин і допомагає клітинному диханню і фотосинтезу. Під час ендотермічних реакцій для вуглецевого обміну потрібна енергія, і ця енергія подається світлом. Світло є основним фактором в процесі фотосинтезу для перетворення діоксиду вуглецю в органічні сполуки, такі як вуглеводи і білки, в яких виділяються вода і кисень. Якщо зростання мікроводоростей здійснюється при обмеженні світла, клітинні механізми прогресують з утворенням вуглецю у амінокислоти і інші важливі сполуки для клітин, але в насиченому освітленні збільшується виробництво цукру і крохмалю, а максимальна швидкість росту стабілізується. Тим не менш, деякі результати свідчать про неконкурентну стратегію освітлення, оскільки темпи зростання залишаються високими, а витрати виробництва зменшуються. Це пов'язано з тим, що поділ клітин для одно ланцюжкової фотосинтетичної культури зазвичай відбувається в умовах недостатнього освітлення. Однак для інших випадків поділ клітин відбувається як в темній, так і в світових фазах, але для мікроорганізмів відбувається більший поділ клітин після зупинки фази освітлення. Більш того, деякі ферментативні механізми можуть бути відключені під час висвітлення [20].

#### **1.1.4. Хімічний склад.**

Використання *Chlorella vulgaris* засноване на дуже високому вмісті в ній біологічно цінних речовин. Мікроводорості містять більше 60 мікроелементів,



концентрація яких значно вище, ніж у наземних рослин. Суха біомаса *C. vulgaris* містить більше 45-50% білків, включаючи незамінні амінокислоти; 30-35% вуглеводів, включаючи в основному крохмаль, целюлозу, геміцелюлозу і розчинні цукру; 5-10% ліпідів. У молодих клітинах, що активно розмножуються, у відсотковому співвідношенні білки переважають вуглеводи, але при досягненні клітин стаціонарної фази, в них переважають вуглеводи.

Ліпіди, як важливі запасні речовини мікрободоростей, також в основному синтезуються під час стаціонарної фази росту. Їх застосовують для отримання нутріцевтичних речовин, таких як омега-3 і омега-6 поліненасичених жирних кислоти (ПНЖК), які в свою чергу корисно використовувати в раціоні харчування людини і тварин; і нейтральних ліпідів, які перспективні для виробництва біодизелю [21].

Доведено, що при зміні абіотичних факторів можна направити метаболізм мікрободоростей на синтез певних речовин, таким чином можна отримати біомасу з різним вмістом білків, ліпідів та вуглеводів. При цьому необхідно забезпечити поєднання чималої кількості факторів, що впливають на рівень накопичення біомаси клітин і її біоорганічний компонентний склад, до яких відносять: вихідну концентрацію клітин в середовищі, склад середовища культивування, інтенсивність освітленості, температуру процесу [22].

На частку вітамінів в біомасі *Chlorella vulgaris* припадають вітаміни груп В, С, РР, Е, каротин. Також в даній мікрободорості містяться необхідні для нормального функціонування організму людини і тварин макро- та мікроелементи: ферум, купрум, манган, цинк, молібден, бор, кобальт, силіцій тощо [23].

Мікрободорості виробляють широкий спектр хімічно активних вторинних метаболітів в якості хімічного захисту від хижаків, травоядних тварин, в умовах екологічного стресу і конкуренції за простір. *Chlorella*

*vulgaris* синтезує природний антибіотик «хлорелін», який ефективно знищує патогенних мікроорганізмів, таких, як стрептококи, стафілококи, кишкова паличка [24].

Було встановлено, що особливо сильно на біохімічний склад клітин мікро водорості *Chlorella vulgaris* впливає дефіцит азотовмісних речовин, стимулюючи накопичення внутрішньоклітинних нейтральних ліпідів - триацилгліцеридів (ТАГ), як запасних поживних речовин. За різними даними [25;26] кількість ліпідів збільшується в 1,7-15 разів. Glacio S. Araujo та інші [27] вивчали створення стресу при культивуванні *Chlorella vulgaris* за допомогою додавання в живильне середовище F/2 NaCl. В результаті було визначено, що вміст NaCl в культуральному середовищі має великий вплив на кількість виробленої біомаси і на кількість ліпідів, що добуваються з мікроводоростей.

Експеримент показав, що збільшення вмісту NaCl в культуральному середовищі дозволяє значно (на 35,6%) збільшити концентрацію ліпідів в сухій біомасі.

Табл. 2. Кількісний склад жирних кислот ліпідів *Chlorella vulgaris* в звичайних умовах росту та при азотному голодуванні. [27]

Назва кислоти	Формула	Звичайна культура (вміст, % мас)	Азотне голодування (вміст, % мас)
Пальмітинова	16:0	23,5	18,0
9-гексадеценова	16:1	2,5	1,5
7,10-гексадекатрійнова	16:2	12,0	3,8
7,10,13-гексадекатрійнова	16:3	11,1	5,0
Стеаринова	18:0	0,6	3
Олеїнова	18:1	3,9	43,2
Лінолева	18:2	21,0	11,0
Ліноленова	18:3	24,2	13,7

З Таблиці 2 видно, що при стресовому культивуванні збільшення вмісту ліпідів відбулося за рахунок збільшення в 11 разів концентрації олеїнової кислоти. Фізіологічна роль процесу накопичення ліпідів при стресових умовах культивування мікро водоростей була пояснена А. Е. Соловченко. В роботі [28] узагальнені та накопичені до цього часу експериментальні дані, що дозволяють виділити, принаймні, три аспекти адаптаційної функції ТАГ у мікро водоростей:

1) Нейтральні ліпіди є джерелом довго ланцюгових жирних кислот - будівельних блоків для мембран;

2) Біосинтез ТАГ забезпечує перешкоджання розвитку фото окислювальних пошкоджень при стресах, що знижують здатність клітини утилізувати продукти фотосинтезу;

3) Відкладені у вигляді ліпідних глобул ТАГ утворюють депо для вторинних каротиноїдів у каротин генних водоростей, що забезпечують захист від фото пошкоджень.

В роботі [29] встановлено, що після припинення стресових умов, біохімічний склад клітин відновлюється, при цьому додавання імідазолу в концентрації 0,5-2,5 ммоль впливає на утворення фото синтезуючого апарату: пригнічується синтез білку, хлорофілу, полі ненасичених і транс-гексадецеенової кислот, однак відбувається синтез вуглеводів. Також імідазол перешкоджає витрачанням накопичених жирних кислот. Отримані результати дозволяють також пояснити процес перебудови біохімічного складу клітин при стресовому культивуванні.

Згідно досліджень [30] було запропоновано доступний спосіб вирощування накопичувальної культури *C.Vulgaris* щільністю до 1 г сухої маси/л з використанням в якості культурального середовища кислотної витяжки золи урини з додаванням нативної урини, яка доповнює відсутні елементи: азот, магній та ін. Аналіз біохімічного складу дослідної накопичувальної культури *C.vulgaris* в порівнянні з контролем і безперервною культурою, а також з періодичними культурами ціанобактерій виявив деякі її переваги:

- Підвищений вміст вітаміну E,
- Підвищений вміст суми незамінних жирних кислот,
- Підвищений показник зольності, ліпідів.

Інші показники досліджуваної культури *C.vulgaris*, такі як вміст незамінних амінокислот, вітамінів B1, B2, каротину і каротиноїдів, мінеральний склад, можливо порівняти з контрольною культурою. З розглянутих джерел азоту у живленні хлорели, поряд з нативною уриною, є перспективним додавання до водної витяжки золи урини сечовини.

Якісний і кількісний склад жирних кислот є різноманітним у різних видів мікро водоростей. 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 мікро водоростей значно вища, ніж у пальмової олії, але поступається соєвій олії. Основні жирні кислоти, що використовуються для виробництва біодизельного палива, представлені у зелених мікро водоростях 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 [31].

За даними, наведеними у роботах [31,32], накопичення триацилгліцеролів є реакцією відповіді мікро водоростей 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 [35]. Можливість керування якісним та кількісним складом цільових продуктів внаслідок направленої зміни метаболізму шляхом варіювання параметрів біотехнологічного процесу культивування мікро водоростей являється вагомим перевагою мікро водоростей перед сільськогосподарськими олійними культурами [35-37].

Цілком імовірно, що в цих організмах роль триацилгліцеролів не обмежується традиційною для них функцією зберігання енергії. Численні дані свідчать, що триацилгліцероли мікро водоростей більше, ніж просто резервуар багатих енергією молекул; вони активно беруть участь у процесах адаптації до стресових умов навколишнього середовища [37].

Причому перевагою в першому випадку була доступність і дешевизна добавки азоту з уриною, а в другому - був відсутній ризик мікробіологічного зараження та накопичення органічної речовини (Табл. 3).

Табл. 3. Мінеральний склад біомаси культури *Chlorella vulgaris* (% від сухої маси).

	Середовище Тамія	Кислотна витяжка золи урини ±30 мл/ дм <sup>3</sup> урини
K	0,65±0,04	0,72±0,08
Na	0,16±0,03	0,76±0,12
Ca	0,04±0,01	0,16±0,08
Mg	1,20±0,11	1,0±0,07
P	2,10±0,15	2,0±0,54
S	0,51±0,02	0,52±0,08
N	5,4±0,52	4,9±0,83
Fe	0,18±0,03	0,56±0,04
Mn	0,08±0,01	0,09±0,01
Cu	0,015±0,005	0,010±0,003
Zn	0,08±0,014	0,08±0,01

### 1.1.5. Застосування.

Біомаса мікроводоростей *Chlorella vulgaris* є перспективним продуцентом для отримання широкого спектру продуктів.

Характерною властивістю клітин мікроводорості *Chlorella vulgaris* є здатність до зміни хімічного складу клітин в широкому діапазоні в залежності від умов культивування (рівень освітленості, складу живильного середовища). Як і вищі рослини, мікро водорості містять нейтральні і полярні ліпіди. Нейтральні ліпіди складаються в основному зі складних ефірів гліцерину. При сприятливих умовах мікро водорості виробляють в основному полярні ліпіди (наприклад, фосфоліпіди).

Полярні ліпіди є структурними компонентами всіх живих клітин, входять до складу цитоплазми, мітохондріальної та інших мембран, грають істотну роль в мембранній проникності, відповідальні за розташування ферментів дихального ланцюга і перенесення електронів. Тому фосфоліпіди широко застосовуються в якості харчових і біологічно активних добавок.

При несприятливих або обмежених умовах зростання мікроводоростей (стресові умови культивування) накопичуються нейтральні ліпіди у вигляді ліпідних крапель у цитоплазмі [38] і є основними запасними компонентами клітини. Полярні ліпіди знаходять широке застосування при виробництві біопалива, біополімерів і інших продуктів.

Технологія комплексного використання біомаси мікроводорості *Chlorella vulgaris* полягає в наступному: штам культивується протягом восьми днів на стандартній живильному середовищі до досягнення стаціонарної стадії зростання, потім для клітин штаму створюються стресові умови шляхом пересадки на живильне середовище з дефіцитом азоту для стимулювання накопичення внутрішньоклітинних ліпідів (Культивування протягом п'яти днів). Потім клітини біомаси відокремлюються від суспензії.

На наступному етапі стінки клітин руйнуються для більш повного вилучення ліпідів. Витяг ліпідів здійснюється сумішшю полярного і неполярного розчинників, при цьому фосфоліпіди будуть міститися у фракції полярного розчинника, а тригліцериди – неполярного.

Витягнуті фосфоліпіди піддаються очищенню і використовуються в якості харчових і біологічно активних добавок для підтримки нервової системи, профілактики неврозів, мігрені, безсоння, очних захворювань, а також відновлення клітин печінки [39].

Залишки біомаси (білки, вуглеводи) піддаються очищенню і використовуються в якості добавки для корму сільськогосподарських тварин

або змішуються з відходами сільського господарства і використовуються для отримання біогазу, рідких і твердих добрив [40].

У даний час світовий обсяг продажів продуктів з мікроводоростей неухильно зростає: він оцінюється більше, ніж в 7 бiльйонiв доларiв США [41].

З огляду на величезне біологічне різноманіття мікроводоростей і недавні розробки в галузі генетичної і метаболічної інженерії, вважається, що мікроводорості, зокрема культура *Chlorella vulgaris*, є найбільш перспективним джерелом широкого спектру продуктів: білки, жирні кислоти, нейтральні та полярні ліпіди, полісахариди, антиоксиданти, вітаміни, барвники, водень, кисень тощо [42].

У сільському господарстві застосовують для підживлення рослин, птахів і тварин, в бджільництві і рибному господарстві. Кормову добавку використовують у вигляді суспензії та пасти, в окремих випадках – у вигляді порошку та гранул.

Включення хлорели в кормові раціони зумовлює зростання м'ясної продуктивності до 35%, молочної продуктивності - до 20%, яйценосності курей – до 30%, а також знижує витрати кормів на 10-15%. Цінність зеленого біокорму ще в том, що він спричиняє підвищення резистентності до різних захворювань. Також суспензія хлорели позитивно впливає на гусениць тутового шовкопряда, прискорюючи їх ріст, та збільшуючи його життєдіяльність [43].

Широко хлорелу використовують і в харчовій промисловості. В Японії практикують отримання з хлорели порошку, який є висококалорійним продуктом, багатим на поживні речовини, його додають до муки та використовують для приготування хлібобулочних виробів. В харчовій та косметичній промисловості в якості натурального барвника широко використовують хлорофіли хлорели. [44].



Проведено багато досліджень, результати яких свідчать, що використання мікроводоростей дає високу ефективність при лікуванні багатьох захворювань, зумовлених порушенням роботи ендокринної та імунної систем, а глікопротеїди та певні компоненти клітинної стінки пригнічують ріст злоякісних пухлин.

Каротиноїди пригнічують утворення вільних радикалів, тому їх розглядають в якості антиоксидантів, оскільки подвійні зв'язки в структурі їх молекул здатні до зв'язування синглетного кисню. Серед пігментів мікроводоростей особливу увагу заслуговують фікобіліпротеїни, які застосовують в якості компонентів протизапальних засобів. Також використання цих пігментів практикують в імунофлуоресцентній діагностиці, де вони виступають в якості міток. Хлорела має бактерицидні властивості і здатна нейтралізувати дію отруйних речовин. Продукти переробки хлорели використовують також в косметології в якості барвників, кремів, емульгаторів, гелеутворювачів і миючих засобів [45].

Були проведені дослідження, які показали можливість використання хлорели для освоєння космосу. Вона може виступати ланкою в замкнених за газом та водою екосистемах, тобто забезпечити біологічну регенерацію повітря та відтворення їжі за рахунок своєї метаболічної активності. Встановлено, що хлорела здатна забезпечувати людину киснем, поглинаючи вуглекислий газ та утилізуючи її продукти життєдіяльності, практично необмежено довго, але при цьому людина не може повністю поглинути всю біомасу хлорели, що синтезується [46].

Останнім часом велику увагу приділено ще одному аспекту застосування мікроводоростей в господарському житті людини - екологічному. Левова частка споруд для очищення стічних вод засновані на біологічному методі очистки. Беручи до уваги економічну ефективність, вважається, що для очищення стічних вод підприємств харчової промисловості, птаховабрик та тваринницьких ферм, перспективним

організмом є хлорела. Мікрородорості здатні не лише до засвоєння органічних речовин та біогенних елементів, вони також виділяють кисень, збагачуючи ним водне середовище, що сприяє окисненню активним мулом забруднюючих речовин, таким чином інтенсифікується процес очищення стічних вод від різноманітних забруднень. Культивууючи мікрородорості в стічних водах, можна як здійснити біологічне очищення стічних вод, так і отримати біомасу, багату білками, вітамінами, елементами тощо. Відомо, що комплекс бактерій з мікрородоростями здатен до деструкції таких ксенобіотиків, як мазут, продукти органічного синтезу, які потрапляють в гідросферу в результаті антропогенної діяльності. Розраховано, що очищення стічних вод біологічними методами, в першу чергу, за допомогою водоростей, коштує в 100 разів дешевше, ніж фізикохімічними, при цьому за рахунок механічного очищення з води видаляється до 30%, фізико-хімічної - до 40%, а біологічної - до 80% органічних забруднень [47].

Існує практика застосування хлорели для очищення газових викидів. Вуглекислий газ, а також оксиди азоту та сірки є основними компонентами димових газів, що зумовлюють глобальне потепління та є причиною кислотних дощів відповідно. Оскільки мікрородорості – автотрофні фотосинтезуючі організми, то вони можуть ефективно споживати вуглекислий газ. Нітроген та Сульфур є макроелементами, тому оксиди даних елементів також в певних концентраціях споживаються мікрородоростями, не пригнічуючи їх росту. Так, були проведені досліді з біоремедіації димових газів, що утворюються з коксової печі металургійного заводу, з'ясувалося, що середня ефективність видалення CO<sub>2</sub> з димового газу може досягати 60%, а ефективність видалення NO і SO<sub>2</sub> підтримується на рівні приблизно 70% і 50% відповідно [48].

Біодизель (*biodiesel*) - це один з видів біологічного палива, який виробляють на основі рослинних або тваринних жирів (жирів), а також

продуктів виробництва складних ефірів з кислот. Залежно від сировини застосовується певна технологія виробництва біодизеля.

Ймовірно застосування для виробництва біодизеля різних видів сировини: рослинне масло (рапсове, соняшникова, пальмова, соєва та ін.); тваринний жир; водорості; гума та пластмаса. Сировиною для виробництва біодизеля служать жирні олії різних рослин або водоростей. Біодизель з ріпаку (біопаливо з ріпаку) - досить широко застосовується в даний час в Європі, а найбільш перспективним джерелом сировини є водорості.

Представник компанії Solix, що виробляє біопальне, стверджує, що якщо замінити всі дизельне пальне, яке використовується в США, на біопаливо з водоростей, то буде потрібно засіяти зеленим сировиною всього 0,5% сільськогосподарських земель штатів, щоб отримати потрібну кількість біодизеля.

Для виробництва біодизеля необхідні водорості, що містять велику кількість масла. Такі водорості можна вирощувати як у відкритих водоймах (в ставках), так і в спеціальних біореакторах. Біореактори займають невелику площу і з них легше діставати водорості для виробництва біодизеля.

Крім того, від інших видів рослинної сировини водорості відрізняються тим, що поглинають вони не спеціальні добрива, а  $CO_2$ . При цьому водорості настільки "люблять" вуглекислоту, що збільшують свою вагу в 15 разів швидше, саме, на цьому раціоні. Якщо до того ж тину витримувати в забрудненій воді, її обсяг кожен день буде збільшуватися в 2 рази.

Один з різновидів виробництва дизельного пального з водоростей задуманий в США. Для виробництва біодизеля водорості поглинають вуглекислий газ і сонячне світло. Установка SolarConverter зовні нагадує сонячну батарею; між панелями поміщається водний розчин, в якому знаходяться водорості. Для цього не потрібні величезні посівні площі і

сільськогосподарські поля. Перший завод з виробництва біодизельного палива з водоростей планують запустити вже в поточному році. [49]

У другому варіанті мікроорганізми розташовуються в установці, що складається з великої кількості скляних труб. Для швидкого росту необхідне світло, вуглекислий газ, корм і підтримання потрібної температури. Корм являє собою особливий склад хімічних речовин і мікроелементів. Для того щоб забезпечити водорості теплом і вуглекислим газом, використовується дизель-генератор, що працює на тому ж біодизелі. Продукт з біореактора знімається кожні десять годин, адже мікро водорості - самі швидко розмножуючі рослини. При гарному догляді їх обсяг збільшується вдвічі всього за 40 годин. З чергової порції врожаю, виходить рослинний жир, з якого і виготовляється біодизель. Для цього використовуються спеціальні масляні водорості з великим відсотком жиру. [50]

Біодизель може використовуватися в простих двигунах внутрішнього згоряння без зміни їх конструкції. Можливе використання біодизеля як самостійного виду пального, так і в суміші зі звичайним (мінеральним) дизельним паливом.

### **1.1.6 Фактори, які впливають на життєдіяльність *Chlorella vulgaris*.**

Життєдіяльність хлорели залежить від багатьох факторів, найбільш важливими з яких є наявність поживних речовин, температура, світло та рН. Ці фактори впливають на ріст хлорели та метаболізм клітин, що в свою чергу зумовлює їх особливий хімічний склад [50].

#### **1.1.6.1. Вплив температури.**

Температура впливає на ферментативні реакції, систему клітинної мембрани та інші характеристики. *C.vulgaris* добре росте при високих температурах, 26-30 °С; погано росте або ж зовсім не росте при 5-10 °С. Причому змінний температурний режим 26-30 °С більш сприятливий для росту хлорели, ніж постійні температури 26 °С або 30 °С [26]. Тому при

культивуванні хлорели допускається коливання температури в межах 4-5 °С. Криві росту для *C.vulgaris*, що культивувалися при різних температурах, представлені на Рис. 4. [51]

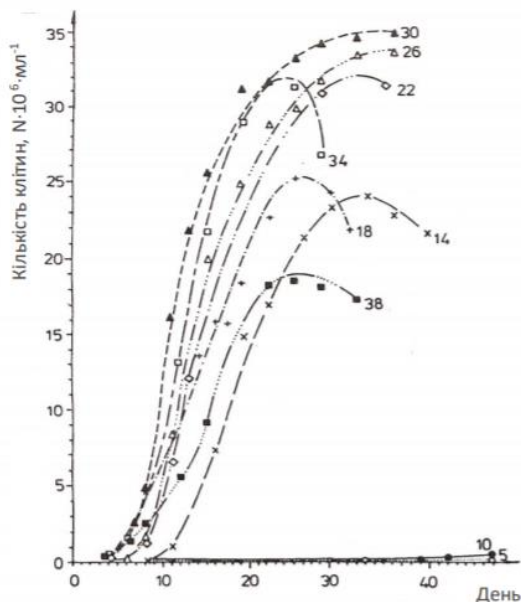


Рис. 4. – Криві росту *C.vulgaris* в залежності від температури[51]

Температура впливає не тільки на ріст мікроводоростей, але й на їх морфологію: зі збільшенням температури спостерігається зменшення об'єму клітин.

Зростання температури призводить до інтенсифікації метаболізму; цей взаємозв'язок пов'язан з біологічним принципом: чим менше організм, тим активніше метаболізм; іншими словами, швидкість метаболізму на одиницю об'єму або одиницю ваги зменшується зі збільшенням розмірів організму [52].

Температура буде також впливати на хімічні процеси в культуральному середовищі. Так, буде посилюватися гідроліз солей, зокрема  $\text{Na}_2\text{S}$ : оскільки даний процес ендотермічний, то відповідно до принципу Ле Шательє при підвищенні температури рівновага ендотермічних процесів зміщується в бік утворення продуктів, отже в культуральному розчині буде збільшуватися концентрація сірководню, який є інгібітором [53]. Таким чином, вплив температури на ріст *C.vulgaris* має неоднозначний характер .

### **1.1.6.2. Вплив рН.**

Показник рН є важливим параметром, оскільки він впливає на утворення комплексів різної розчинності і токсичності, на сорбцію металів на стінках клітин, на продуктивність фотосинтезу. З іншого боку, параметр рН може впливати на ріст хлорели через збільшення абсорбції неорганічних газів.

Оптимум рН для росту *C. vulgaris* знаходиться в нейтральному та слаболужному діапазоні, 7.5-8.0. Кислотні (3.0-6.2) і лужні (8.3-9.0) значення рН уповільнюють ріст даної мікроводорості. Для підтримки внутрішньоклітинного нейтрального рН в кислому середовищі потрібні додаткові витрати енергії для відкачування протонів з клітини, що може бути причиною нестачі АТФ для компенсації енергетичних потреб організму [54].

Проте в інших дослідженнях було отримано інші результати: *Chlorella vulgaris* може рости в широкому діапазоні рН (4-10), і велика продуктивність біомаси досягається в лужному середовищі (рН = 9-10,5) [55].

### **1.1.6.3. Вплив поживного середовища: макро- та мікроелементи.**

Мікроводорості вирощують у водних розчинах, які містять необхідні для росту компоненти. Живильне (або базове) середовище містить воду, набір мінеральних солей, фактори росту (наприклад, вітаміни) Існує кілька типів культуральних середовищ, які класифікують за різними ознаками.

Мінімальне середовище. Культуральне середовище, що містить мінімально необхідні компоненти для росту мікро водоростей. Воно включає тільки неорганічні солі і воду.

Селективне середовище. Використовується для росту тільки певних відібраних організмів. Наприклад, якщо мікро водорості резистентні до певного антибіотика, то його можна додавати до середовища для пригнічення росту інших клітин, які не мають такої резистентності.

Селективні ростові середовища використовуються також для забезпечення виживання і розмноження клітин з певними властивостями, такими як здатність до синтезу певних метаболітів.

Запропоновано багато різних живильних середовищ для культивування мікро водоростей у лабораторних умовах. Більшість з них являють собою модифікацію раніше застосовуваних середовищ, але деякі складені на основі аналізу води з місць існування в природі певних видів, а також з урахуванням екологічних особливостей походження штаму. [56]

Розробляючи або модифікуючи живильне середовище, необхідно враховувати наступне:

- концентрацію і склад іонів таких макроелементів, як калій, магній, сірка, фосфор;

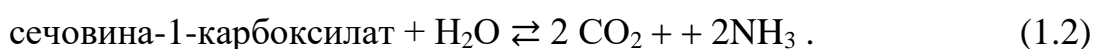
- джерела азоту. Як правило, це нітрати, амонійний азот та сечовина, причому вибір визначається видом водоростей та оптимальним значенням рН. Ріст суттєво залежить від наявності, або, вірніше, доступності азоту.

Відомо, що більшість видів мікро водоростей містять 6-9% азоту в перерахунку на суху біомасу. Виходячи з цього, можна оцінити потребу водоростей в азоті. Зокрема, для утворення 1г біомаси в 1л культуральної суспензії потрібно 0,500,6 г  $KNO_3$  л<sup>-1</sup>. Засвоєння клітиною різних форм нітрогену. Нітроген має позитивний вплив на зростання мікро водоростей і негативний на накопичення ліпідної фракції.

Обмін карбону та нітрогену взаємопов'язаний у мікрководоростях, оскільки вони частково беруть участь як в утворенні сполук карбону в процесі фото дихання з фіксованого  $CO_2$  за автотрофного зростання, так і в утворенні енергетичних сполук, що продукуються у циклі Кребса та електротранспортному ланцюгу.

Йони амонію є найбільш енергетично ефективним джерелом нітрогену, оскільки вступають у реакції синтезу органічних сполук без зміни ступеня окиснення.

Нітрат- та нітритйони, а також сечовина потребують енергетичних витрат клітини для відновлення нітрогену. Також у більшості видів *Chlorella vulgaris* відсутня уреаза. В цьому випадку засвоєння сечовини відбувається за такими реакціями:



У автотрофних умовах амоній транспортується через мембрани клітини та хлоропластів за допомогою родини споріднених білків-транспортерів, що кодуються генами *amt1*.

Нітрат ( $\text{NO}_3^-$ ) та нітрит ( $\text{NO}_2^-$ ) йони транспортуються через мембрани за допомогою родини споріднених білків, що кодуються генами *nar1*.

Білки транспортери амонію поділяються на дві групи: високо споріднені, що регулюються концентрацією нітрогену в клітині, і низько споріднені, активність яких лінійно збільшується при збільшенні концентрації йонів амонію. Амоній міститься в усіх компартментах клітини, його концентрація залежить від рН, електричного потенціалу між компартментами, концентрації  $\text{NH}_4^+$  у сусідньому компартменті, перебігу чи відсутності процесу метаболізму йону.

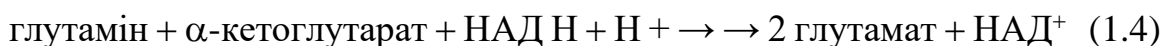
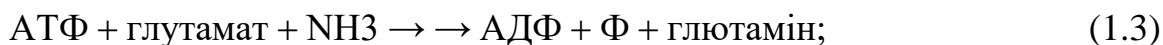
Засвоєння неорганічного нітрогену з утворенням амінокислот відбувається із застосуванням кетокислот оксоглутарату та оксалоацетату за використання енергії АТФ і НАДФ Н. [56]

В автотрофних та гетеротрофних умовах кетокислоти, АТФ і НАДФ Н надходять із циклу Кребса.

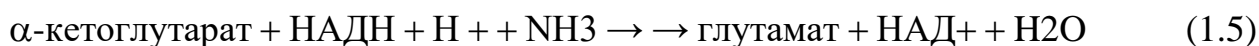


Для хлорели більша кількість кетокислот утворюються за використання гетеротрофних умов і азотного голодування [57].

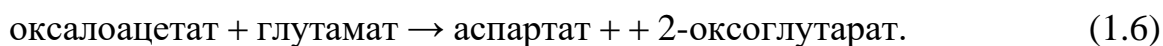
Асиміляція і метаболізм амонію прискорюються за допомогою реакцій, що каталізують глутамінсинтетаза і глутаматсинтетаза:



Крім цього, амоній входить до глутамату в процесі зворотного відновного амінування  $\alpha$ -кетоглутарату за допомогою глутаматдегідрогенази:



Вважається, що рівняння і є основними шляхами асиміляції нітрогену, а останній шлях активний в умовах стресу і відіграє роль катаболічного шунта в обміні азотистих речовин. Після включення амонію в глутамат нітроген входить до інших амінокислот, наприклад через транс амінування оксалоацетату за допомогою аспаргатамінотрансферази:



Аспарагінсинтетаза каталізує АТФ-залежну реакцію:  $\text{АТФ} + \text{аспаргат} + \text{глутамін} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{АМФ} + \text{ФФ} + \text{аспарагін} + \text{глутамат}$ . Глутамін, глутамат, аспаргат, аспарагін забезпечують синтез органічних сполук азоту таких як амінокислоти, нуклеотиди, хлорофіли, поліаміни, алкалоїди тощо.

Споживання амонію призводить до зниження рН живильного середовища, і метаболізм клітини змінюється в бік споживання інших форм нітрогену, таких як нітрат-йон, сечовина та інші органічні форми нітрогену.

У реакції відбувається передача 6 електронів. Відповідно, в умовах темряви буде знижуватись поглинання нітратів. У той же час в умовах освітлення відбувається зниження концентрації таких коферментів, як

флавопротеноїди, ферредоксини і піридиннуклеотиди, які використовуються як донори електронів у реакціях перетворення нітрат- та нітрит-іонів. [58]

Швидкість росту мікро водоростей змінюється залежно від форми нітрогену та карбону, що споживаються. Таким чином, одночасне введення амонійного та нітратного нітрогену має спричинитися до підвищення швидкості росту *Chlorella vulgaris* завдяки саморегуляції засвоєння різних форм нітрогену залежно від зміни умов (рН) у процесі зростання.

Вплив нітрогену на приріст біомаси *Chlorella vulgaris*. Клітини культури *Chlorella vulgaris* попередньо вирощували на середовищі Громова № 6, яке містить нітратну форму нітрогену. форми нітрогену живильного середовища. Протягом 20 діб розвиток культури, вирощуваної за використання різних форм нітрогену, різниться в середньому на  $106 \text{ кл/см}^3$  для  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  і  $\text{KNO}_3$ . Для середовища з  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  спочатку відбувається одночасне поглинання культурою нітратної та амонійної форми нітрогену.

Після 21-ї доби культивування спостерігається значний приріст біомаси мікро водоростей. Найбільший приріст біомаси характерний для середовища з  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , більш повільний – для середовища із сечовиною. Значно нижче накопичення біомаси спостерігається для середовища з  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  і стандартного середовища з  $\text{KNO}_3$ .

На початкових етапах культивування (28 днів) суспензія мікро водоростей у середовищі з  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  мала найвищі показники приросту біомаси. Треба відзначити, що протягом першого тижня культивування приріст біомаси, вирощеної на середовищі із сечовиною, був найвищим, тоді як у інших середовищах приріст культур був уповільненим. Це має особливо важливе значення для найшвидшого накопичення біомаси *Chlorella vulgaris* в умовах промислового культивування. 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 йонів 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.

- *джерела вуглецю*. Вуглець, зазвичай, вводять у вигляді вуглекислого газу в суміші з повітрям або у виді бікарбонату. Треба відмітити, що вибір джерела вуглецю значною мірою залежить від рН, оптимального для росту організму;

- *мікроелементи*. Їх вносять у вигляді сумішей, враховуючи попередньо експериментально встановлену концентрацію кожного з мікроелементів для забезпечення активного росту водоростей. [59]

Для стабілізації суміші мікроелементів використовують комплекс утворюючі сполуки (наприклад ЕДТА);

- *вітаміни та фактори росту*. Для росту багатьох видів водоростей необхідні вітаміни, наприклад В12 (кобаломін).

У 1957 році була розроблена поживне середовище Тамійя [60], яке широко використовується в даний час для культивування біомаси *Chlorella vulgaris*. Роботи по модифікації даного середовища проводилися В.Е.Семененко і Е.Д. Кузнецовим [61], які досліджували продуктивність культури *Chlorella vulgaris* на поживних середовищах Тамійя і Тамійя з сечовиною.

Головним недоліком середовища Тамійя є завищені у кілька разів концентрації магнію та сірки. Тому, було створене нове збалансоване живильне середовище № 3, приріст біомаси на якому був однаковий у

порівнянні з середовищем Тамійя з використанням нітратного азоту, та нижчий на 1% в порівнянні з середовищем Тамійя із сечовиною. У дослідженнях Музафарова [62] про культивування суспензії *Chlorella vulgaris* і її використанні у якості кормової добавки для великої рогатої худоби, використовувалося спеціально розроблене середовище № 4 і модифіковане середовище №4, які дозволяли досягти урожайності 22-24,5 г/м<sup>2</sup> для середовища № 4 і 22,5-26 г/м<sup>2</sup> для модифікованого середовища №4.

Велике дослідження по мінеральному харчуванню мікроводоростей проводив Упітіс [62], який розробив збалансоване середовище А-5П.

За висновками автора, це середовище може бути застосоване для культивування без регулювання рівня рН, коли додавання (в процесі виснаження) елементів проводиться внесенням в суспензію розчину мінеральних солей з концентрацією у 100 разів більше початкової, ніж у вихідному середовищі. Воншак [63] запропонував середовище N-8, яке має широке застосування для масового культивування хлорели. Ramkumar K. Mandalam та ін. в 1998 році встановили, що середовище N-8 є дефіцитним по залізу, магнію, сірки і азоту при високій щільності клітин. Середовище N-8 було перероблено в середовище M-8; це дозволило у 3-5 разів підвищити загальний вміст хлорофілу на одиницю об'єму культури в порівнянні з N-8 середовищем.

Довгострокове культивування (24 дні) *Chlorella vulgaris* на M-8 середовищі показало безперервне збільшення вмісту хлорофілу і біомаси протягом всього періоду вирощування. При цьому збільшення вмісту хлорофілу і біомаси припинилося після 7 і 12 днів відповідно для середовища N-8, що продемонструвало перспективність середовища M-8 для промислового виробництва біомаси.

Таким чином, приріст клітин може бути значно підвищений при відповідному живильному середовищі. Також було встановлено, що базовий

вміст елементів живильного середовища при культивуванні біомаси впливає на біохімічний склад клітин. При наявності сечовини в якості джерела азоту спостерігалось зниження росту клітин на 30%, при цьому створювалися умови для виробництва білку до 0,54 г/г біомаси. З'ясовано, що використання стічних вод, що містять аміак, дозволяє збільшити на 55-60% швидкість росту хлорели і збільшити кількість внутрішньоклітинних ліпідів на 8,5%.

Хелд П. та інші [65] вивчали культивування штаму *Chlorella vulgaris* на поживних середовищах BG-11 TAP і TP. Приріст біомаси на середовищі TAP був в 1,7 рази вищим в порівнянні з середовищем TP і в 16 разів вище в порівнянні з середовищем BG-11 на шосту добу культивування [66].

Живильні середовища, використовувані для культивування *Chlorella vulgaris*, містять макро- і мікроелементи, які забезпечують нормальну життєдіяльність клітин (Табл. 4.).

Табл.4. Необхідні мікро- та макроелементи для нормальної життєдіяльності клітинних мікроводоростей.

Елемент	Вплив та значення елементу
К	Впливає на водно-сольовий баланс клітин та осмотичний тиск.
Mg	Бере участь в аеробному розкладі вуглеводів та ліпідів, активує частину ферментів циклу Кребса, входить до складу хлорофілу.
S	Входить до складу цистеїну та метіоніну в реакціях енергетичного метаболізму.
P	Входить до складу клітинних мембран (фосфоліпиди), бере участь у синтезі білку, в збереженні та переносі енергії АТФ.
Mn	Необхідний для нормального перебігу фотосинтезу, так як входить у склад активного центру киснеутворювального комплексу фотосистеми II. Грає роль в підтримці структури хлоропластів. Активує більш аніж 35 ферментів, в тому числі ферментів-катализаторів реакції циклу Кребса.
Zn	Бере участь в процесах дихання та білкового обміну.
B	Бере участь в обміні нуклеїнових кислот, викликає конкурентне інгібування деяких ферментів.

Для кожного елемента є діапазони концентрації, при виході за межі яких ріст клітин припиняється або настає їх загибель. Мікро водорості активно реагують на концентрацію біогенних елементів в суспензії, змінюючи біохімічний склад клітин, а вміст основних компонентів клітин (білки, вуглеводи, ліпіди) може змінюватися в широких межах.

- При нестачі азоту виникає значне зменшення врожаю біомаси та вміст зольних речовин у ній. Різко збільшується середнє значення сухої ваги клітини, а в органічній речовині зменшується вміст хлорофілу, білків, збільшується кількість ліпідів вуглеводів.

- Нестача сірки характеризується збільшенням середнього розміру клітини і руйнуванням хлорофілу. Відмінними рисами сірчаного голодування є певне зменшення вмісту білку і різке збільшення вмісту ліпідів (при постійному рівні вуглеводів).

- Нестача заліза, магнію і калію не характеризується значними змінами біохімічного складу клітин, лише за винятком помітного зменшення вмісту ліпідів (при магнієвому голодуванні).

Фактори мінерального живлення можна розділити на дві групи, що є основними:

До 1-ї групи входять азот та сірка. Нестача даних елементів не викликає моментального зупинення процесів асиміляції в клітинах водоростей, але досить сильно уповільнює поділ і зупиняє розвиток клітин. Таким чином, клітина накопичує органічні речовини і збільшує свою вагу. Так як при нестачі азоту відбувається повне пригнічення біосинтезу білка, то клітини накопичують безазотисті сполуки (ліпіди та вуглеводи). При сірчаному голодуванні біосинтез білка пригнічується менше, а стимуляція утворення ліпідів при цьому супроводжується деяким пригніченням синтезу вуглеводів.

[67]

До 2-ї групи елементів входить магній, калій, фосфор та залізо. Дефіцит даних елементів негативно впливає, в першу чергу, на процеси асиміляції, коли поділ клітин відбувається зазвичай добре. Унаслідок цього, відбувається уповільнення темпів зростання та накопичення сухої речовини у клітинах: середня вага та середній розмір однієї клітини при цьому не збільшується або навіть зменшується в порівнянні з контролем.

Необхідно відзначити, що змінюючи склад живильного середовища, можна отримувати продукт бажаного складу з різним співвідношенням білків і жирів. Так, на середовищі багатим азотом, *Chlorella vulgaris* може накопичувати від 40 до 88% білків і 5% ліпідів, а при нестачі азоту і надлишку вуглецю в живильному середовищі, навпаки, - 88% ліпідів і 5% білків.

Вивченням впливу складу поживного середовища на біохімічні властивості клітин *Chlorella vulgaris* займалися П. Хелд [37], В. К. Аужанова [39] та ін.

Серед факторів, які визначають продуктивність культур мікродоростей, значну роль відіграють умови мінерального живлення. Від них залежить, не лише інтенсивність росту, але й напрямок біосинтезу культури [68]. Для культивування *Chlorella vulgaris* необхідно включити в склад поживного середовища наступні мінеральні елементи, які можна поділити на дві групи: до 1-ї входять такі макроелементи, як К, Mg, S, N, К, Р; до 2-ї — основні фізіологічно необхідні мікроелементи — Mn, Cu, Zn, Fe, Mo, Co, B.

Нітроген (N) входить до складу амінокислот, білків, протеїнів, ферментів тощо. Забезпеченість клітин цим елементом визначає процеси біосинтезу. Дефіцит N веде до зниження продуктивності біомаси, зменшення кількості хлорофілу в клітинах, збільшується частка вуглеводів та ліпідів [69].

Сульфур (S) входить до складу сірковмісних амінокислот, а отже й до таких життєво важливих сполук як білки, ферменти тощо. При нестачі S

відбувається збільшення розмірів клітин та руйнування хлорофілу. Характерними рисами сірчаного голоду є зменшення вмісту білку та різке зростання ліпідів при постійному рівні вуглеводів [70].

Як і у всіх живих організмів S є макроелементом, що необхідний для нормальної життєдіяльності. Він входить до складу сірковмісних амінокислот, пептидів, білків, ферментів та багатьох інших органічних сполук клітини. Деякі сполуки S беруть участь в окисно-відновних реакціях, біосинтезі та метаболізму різних речовин. Зокрема важлива роль S у визначенні властивостей та структурних перетворень білкової молекули.

Фізіологічна роль S в клітинах хлорели пов'язана з процесами поділу клітин. При нестачі S з'являються клітини діаметром 7 мкм, які не зустрічаються в нормальній популяції *Chlorella vulgaris*. Це свідчить про ураження механізму клітинного поділу при збереженні біосинтезу.

Спостерігається аглютинація клітин, значно зменшується в них вміст хлорофілу та зростає виділення метаболітів у середовище [71].

Також, встановлено, що при культивуванні дрібних, активно фотосинтезуючих дочірніх клітин в поживному середовищі без S спостерігається незначне збільшення розміру клітин та поділ ядра на 2 дочірніх, але далі клітина не розвивається [72].

Якщо голодуючі за S клітини перенести на середовище, що містить тільки S, вони ростуть та збільшуються в розмірах, відбувається синтез ДНК та подальший поділ ядра, але не клітини. При введенні в середовище разом із S N (нітрогену) спостерігається поділ клітини з виходом автоспор.

Нестача S у *Chlorella vulgaris* при зменшенні надходження її до 3,3 г на 1 кг біомаси, що продукується (суха речовина) та нижче. Але швидкість біосинтезу знижується не одразу при недостатній подачі S в поживне середовище, а розвивається поступово на другу добу, тобто на третьому-четвертому подвоєнні біомаси. Нестача S в середовищі є стресовим фактором,



що зумовлює накопичення в клітинах ліпідів на противагу вуглеводів. Однак забезпечення таких клітин одним S не нормалізує їх метаболізм. Це можливо лише при одночасному внесенні в середовище сполук сірки та азоту [73].

Концентрація сульфуру у межах 20-60 мг/дм<sup>3</sup> забезпечує нормальний ріст хлорели. *Chlorella vulgaris* витримує високі концентрації сульфуру в середовищі.

При нормальних концентраціях інших елементів живлення зростання концентрації сульфуру (у формі (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) до 1000 мг/дм<sup>3</sup> не призводить до зниження продуктивності культури, якщо рН підтримується в оптимальних межах.

За участю Фосфору (P) відбувається азотний та вуглеводний обмін. P входить до складу таких важливих компонентів клітини, як нуклеїнові кислоти, фосфоліпіди, АТФ. При нестачі P клітини характеризуються збільшенням частки вуглеводів та ліпідів, погіршуються процеси асиміляції [74].

Хоча Калій (K) не входить до складу таких важливих сполук, як білки, вуглеводи та ліпіди, але він необхідний для нормального синтезу даних сполук. При нестачі K у мікродоростях інгібується фотосинтез та підсилюється дихання, спостерігається хлороз [75].

Роль Магнію (Mg) в живленні фотоавтотрофів дуже суттєва, оскільки він входить до складу хлорофілу. Зв'язаний з органічними речовинами, Mg бере участь у багатьох ферментативних процесах. Згідно з дослідженнями, його дефіцит сповільнює синтез білку та порушує обмін нуклеїнових кислот [75].

При нестачі Натрію (Na) пригнічується ріст мікродоростей, знижується концентрація хлорофілу та вміст органічного азоту у клітинах [75].

У життєдіяльності мікроводоростей велике значення мають незамінні в специфічно-фізіологічних функціях мікроелементи. Залізо (Fe) входить до складу активних центрів таких ферментів, як цитохромоксидаза, каталаза, пероксидаза, а також залізовмістних білків (ферредоксин, залізофлавопротеїди), за участю яких відбуваються окисно-відновні реакції. Манган (Mn) впливає на ріст та розвиток мікроводоростей, а також бере участь у фотохімічних процесах. Його нестача не тільки гальмує ріст, але й змінює морфологію клітин. Мідь (Cu) бере участь в процесах фотосинтезу, впливає на фоторедукцію та входить до складу цитохромоксидази.

Цинк (Zn), як і залізо, входить до складу активних центрів багатьох ферментів, що регулюють білковий, вуглеводний, фосфорний обмін, інтенсивність фотосинтезу, біосинтез нуклеїнових кислот та окисно-відновний потенціал у клітинах. Молібден (Mo) є необхідним для фіксації атмосферного азоту та відновлення нітратів. Кобальт входить до складу вітаміну B<sub>12</sub>, кобаламідних коензимів. Бор (B) збільшує число утворених клітин та загальний вихід біомаси, впливаючи також на ріст клітин після поділу [76].

#### **1.6.4. Вплив освітленості.**

Світло є важливим елементом процесу фотосинтезу, без надходження якого не може підтримуватись на належному рівні життя жодного автотрофного організму. Мікро водорості 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 мікро водоростях, змінюючи якісний та кількісний склад ліпідів [67 –77].

Висока інтенсивність світла призводить до окисних пошкоджень полі ненасичених жирних кислот і змінює кількісний вміст C16:1 (3 транс) в мікро водоростях [78].

Мікро водорості *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 а потрібне світло з довжиною хвилі 450 ÷ 475 нм, для хлорофілу в - 630 ÷ 675 нм, а для каротиноїдів - 400 ÷ 550 нм.

Авторами роботи [79] 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 фото систем. Також було встановлено, що необхідно проводити постійне перемішування середовища для рівномірного освітлення і запобігання утворення зон затемнення [79].

В аналогічному дослідженні [80] використовували сині (450 ÷ 480 нм), білі (теплота 5000 К), зелені (520 ÷ 555 нм), червоні (640 ÷ 700 нм) світлодіоди.

Було встановлено, що найкраще мікро водоростями 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 мікро водоростей. Це пояснюється тим, що зелений спектр освітлення сприяє синтезу карбон гідрату (СН<sub>2</sub>О) в клітині, також зелений фотон має на 20% більше енергії ніж червоний і на 15,5% менше ніж синій [80]. Вважається, що його більша енергія призводить до уповільнення роботи фото систем і, як наслідок, до однакових результатів з червоним спектром через обмежене поглинання каротиноїдами. Низькі результати використання червоних світлодіодів пояснюються обмеженим поглинанням хлорофілу в при неактивному хлорофілі а. Кращі результати синіх світлодіодів пояснюється активною роботою хлорофілу а та

каротиноїдів, але відсутність активності хлорофілу в 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.

Однотимчасне збільшення у середовищі сполук фосфору та азоту призводить до необхідності використання освітлення більшої інтенсивності, оскільки при цьому підвищується швидкість метаболізму [81 – 83].

Застосування комбінації світлодіодів може призвести до підвищення біосинтезу ліпідної фракції, що підтверджують дані роботи [84]. Освітлення інтенсивністю 1400 люкс мікро водорості *Scenedesmus* sp. LX1 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 мікро водоростей. Для *Chlorella vulgaris* необхідним є світло з довжиною хвилі 460 ÷ 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 мікро водоростей, можливе використання зеленого світла для збільшення ефективності фотосинтезу [85].

Використання світлодіодів червоного і синього спектру в теорії мало б задовольнити потреби мікро водоростей та бути оптимальним для накопичення ліпідів. У роботах [86-88] 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 [88] 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 [88]. 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 мікро водорості *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 мікро водорості *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 мікро водоростей 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 мікро водоростями *Chlorella vulgaris* є завданням дослідження.

### **1.1.7. Типи фотобіореакторів.**

Фотобіореактором називають такий апарат, у якому відбувається культивування фото синтезуючих мікроорганізмів. У таких конструкціях

дотримується оптимальний температурний режим, процеси підводу та відводу газових та рідких потоків, контролюється склад поживного середовища і умови всередині фотобіореактора. Закрита конструкція, дотримання та можливість регулювання спеціальних умов дозволяють отримати у декілька разів більший вихід цільового продукту у порівнянні з відкритими ємностями.

На рис. 5 показано пілотне обладнання, на якому навчались вирощувати спіруліну в Інституті біології південних морів ім. О. О. Ковалевського НАН України (ІБПМ).

Рис.5. Пілотна установка ІБПМ. [99]



Промислові установки з вирощування біомаси з хлорели мають вигляд системи неглибоких і не дуже великих за площею басейнів під скляною покрівлею, а іноді — під відкритим небом (залежно від кліматичних умов).

Так, протягом 6 років водорості вирощували у ставках площею до 1000 м<sup>2</sup>. Ставок у Нью-Мехіко має високу ефективність в захопленні CO<sub>2</sub>. Врожайність становила більше 50 г водоростей з 1 м<sup>2</sup> на добу. 200 тис. га ставків можуть продукувати паливо, достатнє для річного споживання 5% автомобілів США (Рис. 6). [99]



Рис.6. Відкритий ставок для промислового вирощування водоростей.

[99]



Однак відкриті басейни не забезпечують алголічної чистоти культури: в суспензії водоростей в значній кількості містяться не лише механічні (порох), але й біологічні (інфузорії, водорості інших родів тощо).

Залежно від конструкції, виділяють наступні типи фотобіореакторів: бульбашкові, газліфтні (аерліфтні), пласкопаралельні, трубчасті.

У бульбашкових та аерліфтних фотобіореакторах водне середовище переміщується газом, що надходить. Проте ефективність перемішування в них різна, що й впливає на величину періоду циркуляції рідини в об'ємі, тобто середню тривалість циклів світло-темрява для кожної клітини. Для бульбашкових фотобіореакторів дана величина дорівнює 1-4 с, а для газліфтних – 10-100 с.

Барботування повітряно-газовою сумішшю забезпечує як перемішування, так і насичення середовища вуглекислотою, тому для збільшення поверхні бульбашок, а отже й поверхні контакту фаз, необхідно зменшити розмір бульбашок. Це досягається пропусканням газу крізь перфоровані пластини.

Бульбашкові колони часто використовують для проведення біотехнологічних процесів оскільки мають багато переваг: простота конструкції, низькі витрати на обслуговування та утримання, високі швидкості масо- та теплопередачі.

У газліфтних фотобіореакторах газ подається в нижню частину резервуару, який обладнаний внутрішньою трубкою (ліфтом). Таким чином біореактор розподіляється на зону, де присутній газ, та зону, без газу. Такий розподіл зон зумовлює вертикальний циркуляційний рух культуральної суспензії (Рис. 7).

Рис. 7 – Аерліфтний фотобіореактор



Аерліфтні фотобіореактори мають ті ж переваги, що й бульбашкові, але, на відміну від останніх, мають більшу ефективність перемішування за рахунок наявності тягової трубки (ліфту).

У пласкопаралельних фотобіореакторах культуральна суспензія розміщується всередині прозорої кювети, що освітлюється зовнішнім джерелом світла з одного чи двох боків; перемішується газом, який подається знизу. Але дана конструкція має ряд недоліків: при великій витраті газу він

виходить практично без перемішування з культуральним середовищем, газообмін зростає до певної межі; щоб запобігти піноутворення – встановлюється механічний піногасник, в якому зосереджується значна кількість культури, яка не отримує світла; зовнішнє джерело світла нагромаджує конструкцію; такий тип фотобіореактору не підходить для всіх видів мікробіодоростей.

Трубчасті фотобіореактори складається з двох модулів, з'єднаних між собою: світлового, який включає прозорі трубки, в якому переважно здійснюється фотосинтез, та газообмінного, що має вигляд резервуару.

Перемішування здійснюється продуванням газу. Завдяки невеликому діаметру трубок, проблеми зі світлопостачанням немає. Газообмінний резервуар дає змогу мікробіодоростям певний час перебувати в темряві, що є необхідним для проведення темнових метаболічних процесів. Недоліками фотобіореакторів даного типу є обростання стінок біореактору мікробіодоростями через недостатню турбулентність перемішування, а також розділення процесу газообміну та фотосинтезу у просторі, внаслідок чого присутня просторова неоднорідність параметрів процесу культивування [99].

## Висновки до підрозділу 1

*Chlorella vulgaris* - це добре вивчений одноклітинний еукаріотичний фототрофний організм, не вибагливий до умов навколишнього середовища і здатний досить інтенсивно розмножуватися, тому дуже широко поширений і зустрічається практично повсюдно. Хлорела широко використовується в різних галузях промисловості для різноманітних цілей, оскільки її обмін речовини досить лабільний та у своєму складі вона містить багато цінних речовин; причому, змінюючи умови культивування, можна направити метаболізм на синтез певних сполук.

Оскільки *C. vulgaris* є мезофільним організмом, то оптимальною температурою для культивування є 26-30 °С. Але температура не однозначно діє на *C. vulgaris*: з одного боку збільшення температури інтенсифікує метаболізм, що призводить до зростання продуктивності мікродоростей, з іншого боку - підвищення температури стає причиною посилення гідролізу сульфідів і як наслідок утворення сірководню, що є інгібітором. Оптимальне рН середовище для культивування хлорели є лужне, оскільки це зумовлює збільшення продуктивності біомаси, а також знижує інгібуючий вплив сульфідів.

Серед описаних фотобіореакторів для лабораторного культивування хлорели найкраще підходить аерліфтний тип, оскільки він має багато переваг (простота конструкції, низькі витрати на обслуговування та утримання, високі швидкості масо- та теплопередачі), а також він забезпечує найвищу інтенсивність перемішування та кращу розчинність сполук, що є необхідною умовою для живлення мікродоростей.

## 1.2. Роль вуглекислого газу в життєдіяльності клітин *Chlorella vulgaris*

### 1.2.1. Розчинність CO<sub>2</sub> у середовищі.

Діоксид вуглецю завдяки своїм властивостям, реальної можливості існування в газоподібному, рідкому і твердому стані, широкому і різнобічному застосуванню в природі і техніці відомий також під назвами: вуглекислий газ, вуглекислота, двоокис вуглецю, сухий лід.

У природі в круговороті органічних сполук діоксид вуглецю служить однією з основних складових процесу фотосинтезу в зелених рослинах, перетворюючись під впливом поглиненої хлорофілу сонячної енергії в найрізноманітніші і складні органічні сполуки, і в той же час він є кінцевим продуктом розпаду в процесі життєдіяльності рослин і тварин (цикл Кребса). Діоксид вуглецю, таким чином, являє собою невід'ємний компонент природних процесів асиміляції і дисиміляції - основи існування всього живого (Кретович, 1964). [100]

Діоксид вуглецю в газоподібному стані є обов'язковою частиною атмосферного повітря. При цьому концентрація його в повітрі коливається в залежності від загальної екологічної обстановки середовища в межах від 0,03% до 0,5%. У гідросфері, океанській воді і в воді мінеральних джерел розчинено набагато більшу кількість - до  $1,4 \times 10^{14}$  т. У значних кількостях CO<sub>2</sub> виділяється в атмосферу у вигляді газу з природних газових свердловин, з підземних утворень в районах вулканічної активності, з деяких мінеральних джерел, а також з димовими і газами різних хімічних виробництв. Певною мірою в природі відбувається саморегулювання змісту вільного діоксиду вуглецю в атмосфері за рахунок поглинання його зеленими рослинами. Підтримка і всесвітнього розвитку зеленого покриву Землі є одним з найбільш ефективних шляхів нормалізації екологічної рівноваги в умовах лавиноподібного забруднення, обумовленого часто нерозумної господарської

діяльністю людини в гонитві за технічним прогресом. Своєрідна унікальність діоксиду вуглецю виходить з його фізичних і хімічних властивостей.

Молекулярна маса  $\text{CO}_2$  дорівнює 44,011. Молекула діоксиду вуглецю має симетричну форму  $\text{O} = \text{C} = \text{O}$  з відстанню  $\text{C} = \text{O}$  рівним 1,162 А. Хімічні зв'язку між атомами молекули ковалентних і полярні. Дипольний момент дорівнює нулю.

Однак, дослідження останніх десятиліть (Морквяник, Охлабистін 1979) показують, що при адсорбції кисню на різних окислах можливе утворення аніон-радикалів типу  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{O}^-$ ,  $\text{O}_3^-$  і їх активація. У зв'язку з цим можливість утворення аніон-радикала діоксиду вуглецю в певній мірі може з'ясувати здатність набрання ним реакції в процесі фотосинтезу в зелених рослинах, а також активацію в адсорбційно-десорбційних процесах в верх критичному стані. [100-101]

Аніон-радикал  $\text{CO}_2^-$  НЕ лине, кут  $\text{O} = \text{C} = \text{O}$  складає  $135^\circ$ , по видимому, він має негативу спорідненість до електрону. Пряме хімічне відновлення  $\text{CO}_2$  протікає важко. Але в той же час аніон-радикал діоксиду вуглецю нестійкий  $\text{CO}_2^- - \text{E} = \text{CO}_2$ . Для аніон-радикала найбільш характерними є реакції, в яких він виступає в ролі одно електронного відновника. Встановлено здатність аніона-радикала до передачі електрона хінони, аліфатичними нітросполуками, альдегідів і деяким іншим карбонільним з'єднанням. Для участі в реакціях аніон-радикалів необхідні певні умови на кордоні гетерогенних систем.

Можливо, що в зв'язку зі здатністю діоксиду вуглецю утворювати аніон-радикали, знаходиться і його фізичне властивість вступати в кристалогідраті взаємодії з молекулами води. [102]

У звичайних умовах (Піменова, 1982) діоксид вуглецю інертний. Реакції між зневоднених  $\text{CO}_2$  та іншими сполуками можливі тільки при високих температурах. При цьому він проявляє себе активним окиснювачем і реагує з сильно позитивними металами, віддаючи повністю або частково свій кисень.

Тут і далі багато хімічні та фізичні характеристики діоксиду вуглецю цитуються по монографії Герасименко В.В. (Герасименко, 1980).

Взаємодія діоксиду вуглецю з водою. У водних розчинах діоксид вуглецю поводить неординарно. При атмосферному тиску  $\text{CO}_2$  розчиняється у воді незначно з утворенням вугільної кислоти, що володіє слабкими кислотними властивостями [102]



У водних розчинах діоксид вуглецю присутній орто-форма вугільної кислоти -  $\text{H}_4\text{CO}_4$ . Слід зазначити, що активного утворення вугільної кислоти при контакті діоксиду вуглецю з водою не відбувається. Розчинена вугільна кислота швидко дисоціює. У вигляді кислоти у воді знаходиться лише до 0,1%  $\text{CO}_2$ .

З практики відомо, що присутність води в ізотермічному резервуарі для зберігання  $\text{CO}_2$  може викликати утворення льоду. Але це відбувається не за рахунок утворення водяного льоду, а за рахунок утворення газогідратів ( $\text{CO}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{CO}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) або кислоти  $\text{H}_2\text{CO}_3$ . Ймовірність утворення льоду і газогідратів тим менше, чим вище ступінь осушення діоксиду вуглецю. [103]

Концентрація водневих іонів (рН) у водних розчинах діоксиду вуглецю практично не залежить від його концентрації. При зміні тиску від 200 до 2340 кПа і концентрації  $\text{CO}_2$  у воді від 2 до 80 г/л рН становить 3,5 - 3,2. Однак, на рН середовища впливає присутність  $\text{CO}_2$  в концентрації вище 0,4%, що спостерігається на практиці в бродильних технологіях.

Дисоціація діоксиду вуглецю. Діоксид вуглецю термічно стійкий і при високій температурі дисоціює на  $\text{CO}$  і  $\frac{1}{2} \text{O}_2$ . Реакція розпаду може йти по наступному рівнянню:



Частка диссоційованого CO<sub>2</sub> при 2000 °C становить 2%, при 2900 °C - 50%, при 5000 °C - 99%.

Ця реакція може протікати також під впливом ультрафіолетових променів, при цьому розпад досягає 3% при атмосферному тиску і зростає до 46% при тиску 3,6 МПа. [104]

Слабкий електричний розряд також викликає розпад діоксиду вуглецю, а отриманий в результаті його кисень частково перетворюється на озон. Дія озону на CO<sub>2</sub> викликає зрушення реакції вліво, тобто тим самим зупиняється розпад молекули CO<sub>2</sub>.

Дані про протікання реакції розпаду CO<sub>2</sub> становлять значний практичний інтерес, зокрема при розробці нових та удосконаленні існуючих схем очистки газів бродіння від домішок. Зневоднений діоксид вуглецю, як газоподібний, так і рідкий не отруйні метали, але при обводнюванні може викликати досить сильну корозію. Діоксид вуглецю не горючий і не підтримує горіння внаслідок того, що знижує концентрацію кисню в місці горіння. У високих концентраціях він не підтримує і дихальні процеси, що може бути використано, як стерилізує фактор.

Взаємодія CO<sub>2</sub> з аміаком. При взаємодії діоксиду вуглецю з аміаком в водному розчині утворюється карбонат амонію



Запропоновано спосіб отримання бікарбонату амонію в промислових масштабах з газів бродіння спиртового виробництва, заснований на цій реакції.

В результаті взаємодії CO<sub>2</sub> з газоподібним аміаком утворюється бікарбонат амонію





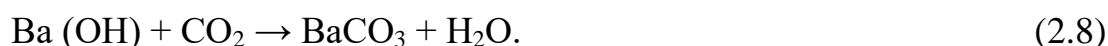
На цій реакції заснований промисловий так званий аміачний спосіб отримання кальцинованої соди  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  з кухонної солі.

Якщо реакція взаємодії  $\text{NH}_3$  і  $\text{CO}_2$  протікає при підвищених температурах і тиску, то утворюється карбамінової-кислий амоній, який після дегідратації перетворюється в карбамід:



На цих реакціях заснований промисловий спосіб отримання карбаміду, що є, як відомо, цінним концентрованим добривом, сировиною у виробництві органічних пластмас. У спиртової промисловості карбамід використовується в якості додаткового азотистого харчування при виробництві кормових дріжджів на барда.

Взаємодія  $\text{CO}_2$  з лугами,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  і моноетаноламіном. Діоксид вуглецю активно реагує з гідроокисами лужних і лужноземельних металів з утворенням відповідних карбонатів:

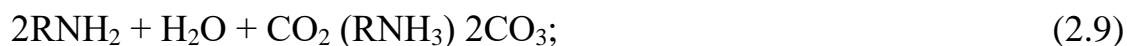


На реакціях такого типу засновані методи якісного і кількісного визначення  $\text{CO}_2$ . Розчини карбонатів калію (поташу) і натрію (кальцинованої соди) також добре поглинають  $\text{CO}_2$ , перетворюючись при цьому в бікарбонатні розчини. (14). При низьких температурах вона зміститься вправо. Йде хемосорбція  $\text{CO}_2$ , а при високих - вліво, тобто йде десорбція  $\text{CO}_2$ . На цих реакціях засновані промислові способи добування  $\text{CO}_2$  з газових сумішей, в тому числі і способи отримання рідкого діоксиду вуглецю з димових газів.

Рівноважні стану систем  $\text{CO}_2$  водний розчин  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CO}_2$  водний розчин  $\text{K}_2\text{CO}_3$  в діапазоні різних концентрацій і температур описуються емпіричними рівняннями, докладно описаними в спеціальній літературі.

Останнім часом для промислової хемосорбції CO<sub>2</sub> почали успішно застосовувати моноетаноламін NH<sub>2</sub> (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OH), який зараз майже повністю витіснив всі інші абсорбенти.

Розчини моноетаноламіна є абсорбентами діоксиду вуглецю. Процес хемосорбції CO<sub>2</sub> моноетаноламіном йде з утворенням карбонату і дікарбоната моноетаноламіна і може бути виражений такими реакціями:



де R = C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OH.

Ці реакції є оборотними. При температурі 35 - 45°C вони йдуть зліва направо - відбувається поглинання CO<sub>2</sub>. При підвищенні температури до 105°C і вище, тобто при кип'ятінні розчину моноетаноламіна, реакції йдуть справа наліво - відбувається виділення CO<sub>2</sub>. [105-107]

Виділення діоксиду вуглецю з насиченого розчину моноетаноламіна при атмосферному тиску утруднено через неповне розкладання карбонату. Тому на практиці десорбції CO<sub>2</sub> ведуть при температурі 110 - 115°C, що найбільш оптимально.

### **2.2.2. Аналіз досліджень впливу CO<sub>2</sub> на приріст біомаси зелених мікрободоростей.**

Споживання CO<sub>2</sub> мікрободоростями залежить від різних параметрів, таких як вид водоростей, тип системи вирощування, співвідношення поживних речовин, інтенсивність світла, температура, рН, концентрація CO<sub>2</sub> та витрата газу (Cheng et al., 2013). Було проведено багато досліджень з фіксації CO<sub>2</sub> з використанням різних видів водоростей. Серед них, *Chlorella vulgaris*, яка може переносити високі концентрації CO<sub>2</sub>, має високу фотосинтезуючу здатність, і може підтримувати високі темпи зростання та швидкість фіксації CO<sub>2</sub> у широкому діапазоні (діапазон концентрацій CO<sub>2</sub> від

0,04 до 18% (об / об)). [108]

Системи вирощування водоростей відіграють вирішальну роль у процесі фіксації CO<sub>2</sub>. Існує два типи системи вирощування водоростей для фіксації CO<sub>2</sub>, що включають відкриті ставки для доріжок та закриті фотобіореактори. Закриті фотобіореактори порівняно з відкритими ставками забезпечують кращий контроль умов експлуатації та підвищення ефективності біофіксації (Kasiri et al., 2015 рік; Раззак та ін., 2013). Інші переваги біореактора в галузі біохімічних речовин - це простота стерильних операцій та відповідна гідродинаміка для біокаталізаторів, чутливих до турбулентності. [109]

У біохімічних процесах можуть застосовуватися різні біореактори. Серед них і прості можна навести бульбашкову колону та реактор ерліфтного транспорту (ALR) із внутрішньою петлею та зовнішньою петлею. ALR має краще змішування, більш придатне тепло і масообмін, ніж бульбашкова колонка завдяки існуванню тягової трубки, і деякі її переваги включають просту конструкцію без рухомих частин, таких як мішалка та низьке споживання енергії (Chen et al., 2016; Чисті, 1998). [110]

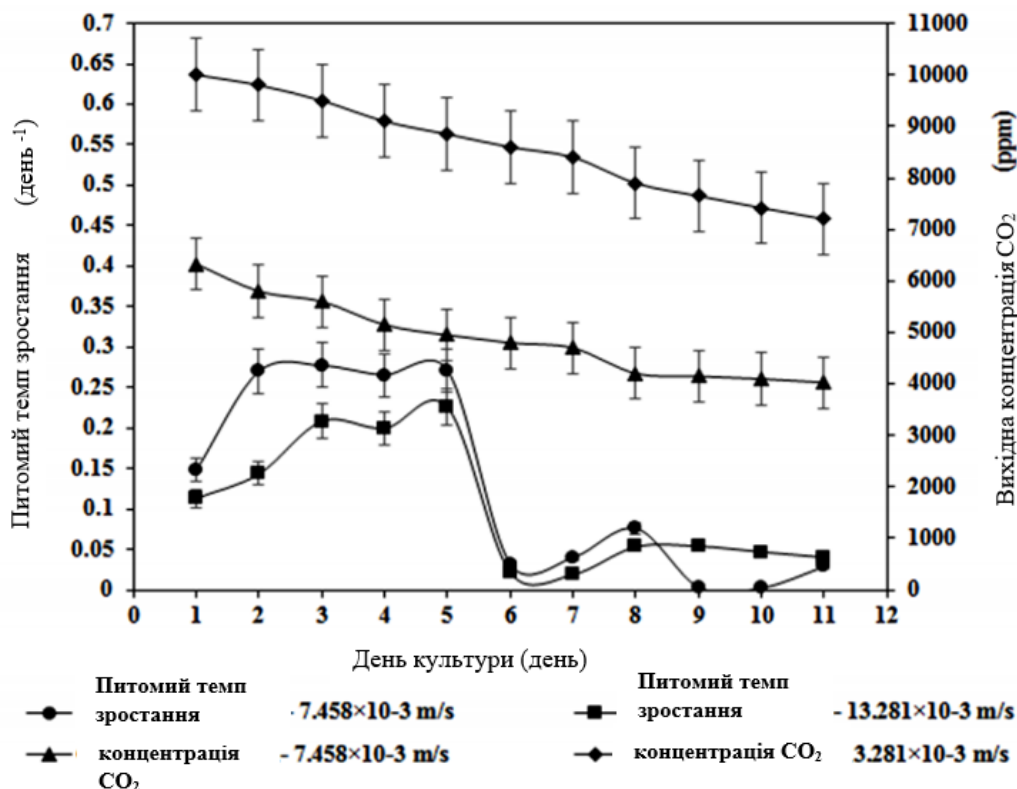
Оскільки CO<sub>2</sub> та поживні речовини необхідні для росту водоростей, ALR має такі параметри, як затримка газу та швидкість циркуляції рідини, що відіграють ключову роль. Затримка газу та швидкість циркуляції рідини є функцією швидкості вхідного газу (Bitog et al., 2014; Наяк та ін., 2014). Крім того, швидкість потоку газу відіграє велику роль для водоростей під час їх зростання, контроль рН, створення оптимального внутрішнього змішування та запобігання накопиченню кисню в системі (Kumar et al., 2010). Більшість досліджень у галузі біофіксації CO<sub>2</sub> були зосереджені на впливі різних рівнів CO<sub>2</sub>, впливі видів мікрободоростей, вплив температури та вплив інтенсивності світла на швидкість фіксації CO<sub>2</sub> (Basu et співавт., 2013; Ченг та ін., 2013). [110-111]

Коли CO<sub>2</sub> потрапляє в реактор, він досягає рівноваги з водною фазою.

Тоді CO<sub>2</sub>, пройшовши через газорідні плівкові опори, виходить на поверхню мікроорганізму. Нарешті, під час реакції фотосинтезу CO<sub>2</sub> споживається і фіксується у присутності світла (Cheng et al., 2013; Concas et al., 2012). Рис.8 показує вплив поверхневої швидкості вхідного газу на концентрацію вихідного CO<sub>2</sub> з верхня частина біореактора за час культури, також. Результат показує, що в кінці першої доби, вихідні концентрації CO<sub>2</sub> з верхньої частини біореактора в газі при поверхневій швидкості  $7,458 \times 10^{-3}$  та  $13,281 \times 10^{-3}$  м/с становили 6300 та 10000 ppm відповідно. [112]

Крім того, ці значення в останній день становили 4000 та 7200 проміле відповідно. Результат продемонстрували, що концентрація CO<sub>2</sub> на виході зменшилась із часом культивування в обох газах прискорилося за рахунок збільшення концентрації клітин і споживання CO<sub>2</sub> протягом фотосинтезу. Також в'язкість культури підвищується за рахунок збільшення клітинної культурної щільності, яка згодом зменшує концентрацію CO<sub>2</sub> на виході через збільшення газу час утримання та споживання CO<sub>2</sub> (Chiu et al., 2008). Коли вхідний газ має зростаючу поверхневу швидкість, концентрація CO<sub>2</sub> у верхній частині реактора збільшується за рахунок скорочення часу утримання газу і, отже, зменшується споживання CO<sub>2</sub>. [113]

Рис.8. Вплив поверхневої швидкості вхідного газу на час культивування на швидкість росту та концентрація вихідного CO<sub>2</sub> з верхньої частини біореактора.



Відповідно до досліджень Сяонін Лю, Кечжень Ін, Ріст *C. vulgaris* для кожної культури був показаний на графіку на Рис.9. Загалом усі оброблені CO<sub>2</sub> культури продемонстрували кращий ріст порівняно з атмосферним повітрям. Кінцева концентрація біомаси, представлена у вигляді сухої маси, досягала 0,18, 0,62, 1,00, 1,12 та 0,63 г/л<sup>-1</sup> для повітря 0,04%, 1%, 5%, 10% та 20% аерації CO<sub>2</sub> відповідно. Щодо культури з барботажем повітрям, біомаса досягла максимуму протягом 3 днів і зберігалася стабільною протягом решти періодів культивування. [114] Серед збагачених CO<sub>2</sub> процедур виявлено, що найвища концентрація біомаси збільшена за рахунок збільшення концентрації CO<sub>2</sub> з 1% до 10%, тоді як біомаса була зменшена шляхом подальшого підвищення концентрації CO<sub>2</sub> до 20%. Подібним чином, в деяких інших дослідженнях також було виявлено, що збільшення концентрації CO<sub>2</sub> належним чином може призвести до посилення приросту біомаси. Рю та ін. (2009) досліджували ріст

*Chlorella sp. AG10002* при концентраціях CO<sub>2</sub> 0,5, 1,0, 2,0 та 5,0% і виявили, що максимальна концентрація клітин 2,02 г/л 205 1 була досягнута при 5,0% CO<sub>2</sub>.

Мехрабаді та ін. (2017) [115] зазначили, що максимальна продуктивність біомаси спостерігалася з додаванням 10% CO<sub>2</sub> в літні умови при високоочисних водоочисних мезокосмах. Однак були й інші результати.

Ханагата та ін. (1992) спостерігали, що і у *Scenedesmus*, і у *Chlorella* був приблизно однаковий темп зростання, коли концентрація впорскуваного CO<sub>2</sub> становила від 10% до 30%. Також було встановлено, що *Chlorella sp. KR-1* може підтримувати хороший ріст при подачі повітря, що містить до 30% CO<sub>2</sub> (Sung et al., 1999). Різницю можна пояснити переносимістю видів мікроводоростей на високу концентрацію CO<sub>2</sub>. Результати Yue та Chen (2005) також виявили, що при більш високих концентраціях CO<sub>2</sub> темпи зростання мікроводоростей почали повільно знижуватися. У цьому дослідженні найвища біомаса була отримана при подачі 10% CO<sub>2</sub>. Тому 10% CO<sub>2</sub> здавалося оптимальною концентрацією газу для росту *C. vulgaris*. Загальний питомий темп приросту для кожної культури був оцінений на основі рівняння. Як правило, питомий темп приросту для кожної культури в цьому дослідженні з часом поступово зменшувався, як це видно на Рис. 10. [116] Отже, період культури був поділений на чотири стадії (d<sup>0</sup> – d<sup>1.5</sup>, d<sup>1.5</sup> – d<sup>2.5</sup>, d<sup>2.5</sup> – d<sup>4.0</sup> та d<sup>4.0</sup> – d<sup>6.5</sup>) відповідно до значних змін нахилу, так що можна досягти кращої регресії для кожного етапу, а також більш точної оцінки конкретного темпу зростання. На кожному етапі культура, дозована повітрям, демонструвала найнижчий питомий темп зростання порівняно з культурами, що забезпечуються газом, збагаченим CO<sub>2</sub>, що рішуче свідчить про те, що звичайна аерація повітря не може задовольнити вимогу поглинання вуглецю для експоненційного зростання. Протягом усього періоду культури найвищий питомий темп росту завжди був на стадії 1 (d<sup>0</sup> – d<sup>1.5</sup>), досягаючи 0,94 ± 0,06, 1,24 ± 0,03, 1,34 ± 0,04, та 1,27 ± 0,04 d<sup>-1</sup> для повітря, 1%, 5% та 10% відповідно,

тоді як найвищий питомий темп приросту  $0,77 \pm 0,03 \text{ d}^{-1}$  на стадії 2 ( $d^{1,5} - d^{2,5}$ ) для 20 %  $\text{CO}_2$ . Відповідно до результатів біомаси, культура з 20%  $\text{CO}_2$  мала найнижче значення  $\mu$  протягом етапу 1. З іншого боку, культури з аерацією 1%, 5% та 10%  $\text{CO}_2$  мали подібний питомий темп зростання для перші 1,5 дня. Хоча на першій стадії було виявлено значну різницю між питомою швидкістю приросту 5% та 10%  $\text{CO}_2$ , концентрація біомаси не показала великої різниці серед цих культур (Рис. 9). Цікаво, що вони не мали ні однакової швидкості масообміну, ні однакової рівноважної концентрації розчиненого  $\text{CO}_2$ .

Відповідно до рівняння Моно,

$$\mu = \mu_{\text{max}} \times C_c / (K_c + C_c), \quad (2.11)$$

питома швидкість росту ( $\mu$ ) обмежується концентрацією субстрату ( $C_c$ ). Отже,  $\mu$  змінюється у відповідь на різні концентрації розчиненого  $\text{CO}_2$ , якщо тільки концентрація розчиненого  $\text{CO}_2$  не набагато перевищує коефіцієнт напівнасичення ( $K_c$ ), коли мікрободорості можуть рости майже з максимальною питомою швидкістю. У нашому випадку можна припустити, що а) в початкові  $d^{1,5}$ , завдяки нижчій концентрації біомаси  $i$ , як наслідок, меншій швидкості поглинання  $\text{CO}_2$ , рівноважна концентрація  $\text{CO}_2$  була досягнута і підтримувалася; і б) навіть рівноважна концентрація для 1%  $\text{CO}_2$  повинна бути набагато вищою, ніж  $K_c$ . Виходячи з цих припущень, розумно, що  $\mu$  був майже однаковим серед культур із дозуванням 1%, 5% та 10%  $\text{CO}_2$  на першій стадії росту. [117]

На етапі 2 ( $d^{1,5} - d^{2,5}$ ) питома швидкість росту знизилась у всіх культурах, включаючи ті, що мають аерацію 1%, 5% та 10%  $\text{CO}_2$ . Причиною може бути те, що швидкість масообміну  $\text{CO}_2$  більше не могла відповідати підвищеній витраті  $\text{CO}_2$  разом із збільшенням біомаси, і в результаті  $C_c$  зменшилась. На цьому етапі 10%  $\text{CO}_2$  демонструвала найвищий питомий темп приросту близько  $0,90 \text{ d}^{-1}$ , а потім 5%  $\text{CO}_2$  ( $0,83 \text{ d}^{-1}$ ) та 1%  $\text{CO}_2$  ( $0,78 \text{ d}^{-1}$ ). Такі результати узгоджуються з тим фактом на Рис. 9 [118], що різниця в концентрації біомаси

серед них стала очевидною. Варто зауважити, що питомий темп приросту 20% CO<sub>2</sub> трохи збільшився, ніж на першій стадії, і не мав суттєвої різниці з рівнем 5% CO<sub>2</sub>. Зроблено висновок, що *C. vulgaris* досягла 20% концентрації CO<sub>2</sub> після початкового страждання від гальмування. Починаючи зі стадії 3 (d<sup>2.5</sup> – d<sup>4.0</sup>) до стадії 4 (d<sup>4.0</sup> – d<sup>6.5</sup>), питома швидкість росту культур, що постачаються на 1%, 5% та 10% CO<sub>2</sub>, зазнала подальшого зниження з 0,3–0,4 d<sup>-1</sup> до 0,2–0,3 d<sup>-1</sup>, можливо через або зниження ефективності подачі вуглецю, або виснаження N і P у середовищі. Тоді як питома швидкість зростання 20% CO<sub>2</sub> коливалася від 0,3 до 0,5 d<sup>-1</sup> на стадіях 3 і 4. Тому можна припустити, що можна розглянути більш тривалий час дозування CO<sub>2</sub>, особливо коли концентрація біомаси зростає, а також поповнення середовища з азотом і 20% аерація CO<sub>2</sub> має теоретично найвищий коефіцієнт передачі маси CO<sub>2</sub>, забезпечуючи найкращі показники росту.

Результати показали, що біомаса мікроводоростей зростала зі збільшенням концентрації CO<sub>2</sub> з 1% до 10% CO<sub>2</sub>. Однак він почав страждати від гальмування при введенні 20% CO<sub>2</sub>. Низький темп зростання при 20% -ній аерації CO<sub>2</sub> обумовлений нижчими значеннями рН стічних вод через високу концентрацію CO<sub>2</sub> та пригнічення самої високої концентрації CO<sub>2</sub> (Concas et al., 2013). Висока концентрація CO<sub>2</sub> може збільшити масообмін CO<sub>2</sub>, але низький рН також пригнічує вплив на фермент фіксації вуглецю та активність Рубіско в механізмі концентрації CO<sub>2</sub>, що призводить до пригнічення фізіології та росту мікроводоростей (Rinanti et al., 2014; Zhao and Su , 2014). Для концентрацій CO<sub>2</sub>, що варіюються від джерела димових газів, адаптація *C. vulgaris* до високої концентрації CO<sub>2</sub> може бути необхідною для безпосереднього використання викидів газів.



Рис. 9. Зростання *C. vulgaris* під подачею CO<sub>2</sub> (n = 3).

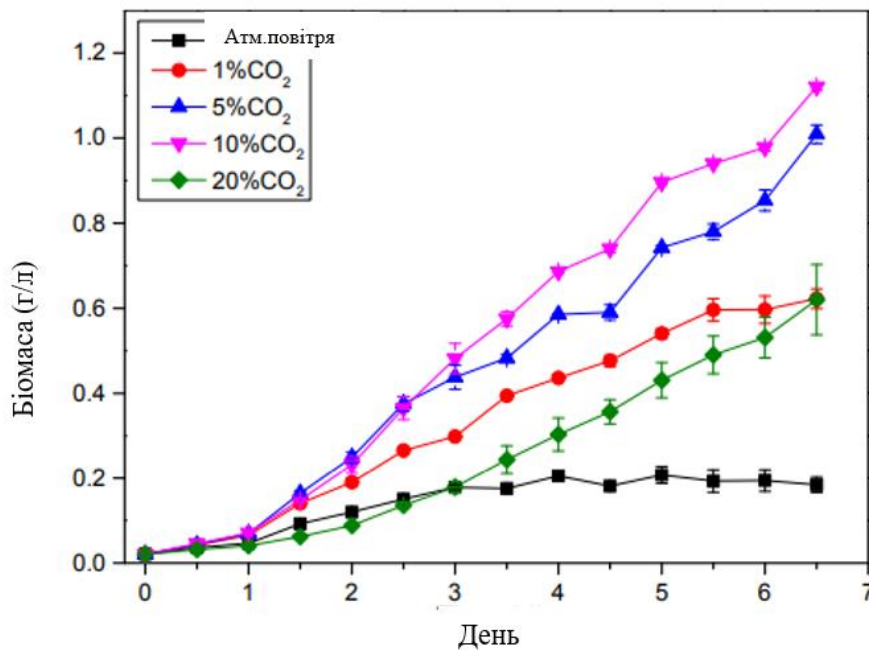
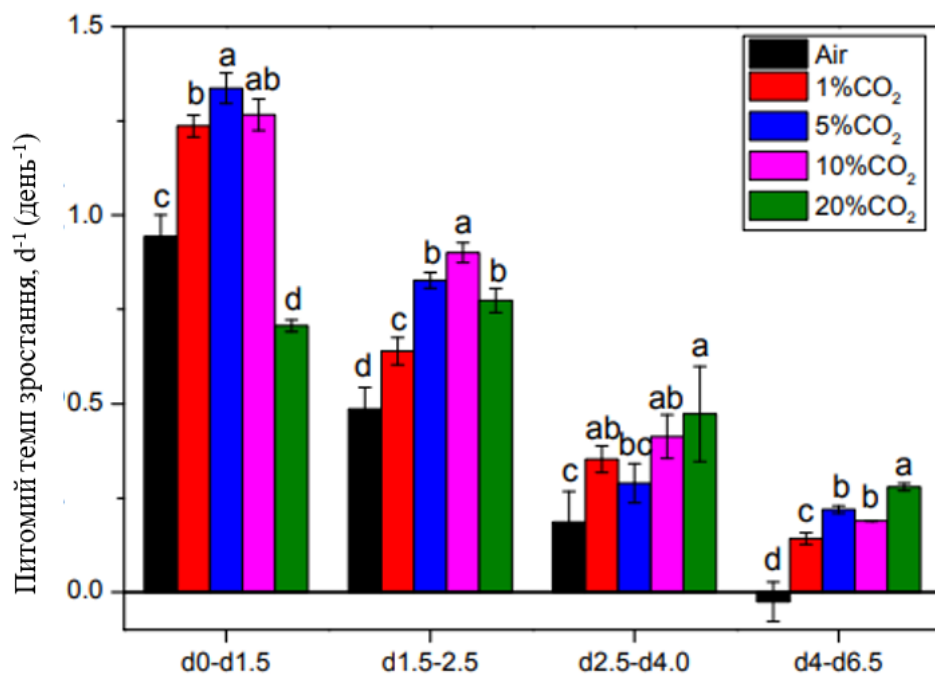


Рис. 10. Підсумок питомої питомої швидкості приросту при подачі CO<sub>2</sub> (n= 3).



Де період культури був поділений на чотири стадії (d0 – d1.5, d1.5 – d2.5, d2.5 – d4.0 та d4.0 – d6.5)

Юн та ін. (1997) припустили, що після того, як *C. vulgaris*, культивований у стічних водах, адаптувався до 5% CO<sub>2</sub>, ріст *C. vulgaris* значно

покращився при 15% CO<sub>2</sub>. Цей результат передбачає, що мікроводорості можуть переносити високі концентрації CO<sub>2</sub>, коригуючи свою анатомію та перерозподіл певних клітинних органел (Parazi et al., 2008), тоді як зовні вони можуть виділяти різноманітні сполуки серед інших, забезпечувати доступність поживних речовин або обмежувати ріст конкурентів (Річмонд, 2004). Таким чином, *C. vulgaris* може мати сильну адаптацію, щоб переносити високу концентрацію CO<sub>2</sub>. [110-120]

## Висновки до підрозділу 2

Надзвичайно висока подача чистого CO<sub>2</sub> може сильно зменшити ріст досліджуваних водоростей. Можливо, це могло бути пов'язано з токсичністю вуглекислого газу для всіх фототрофних організмів, коли вони присутні у дуже високих концентраціях.

За опрацьованими дослідженнями [110-120] швидкість росту зростала зі збільшенням кількості годин барботування CO<sub>2</sub> при 250 мл/хв з 0 годин до 9 годин на день і починає зменшуватися. Дуже низький рН 4,5 був зафіксований під час барботування чистого CO<sub>2</sub>[119], і рН підвищувався в той час, коли не було барботування CO<sub>2</sub>. Значення рН у колбі реактору, де відбувалось барботування протягом лише однієї години на день, зросло найбільше, приблизно до 8,0 за той час, коли барботування не проводилось. Глибокі коливання рН через періодичне барботування чистого CO<sub>2</sub> могли спричинити низький ріст.

Барботування протягом двох хвилин на день призводило до поліпшення темпів зростання на день, оскільки рН не сильно коливався. У тих, кого пускали з бульбашками 24 години на добу, приріст біомаси дуже малий, оскільки рН був дуже низьким у середньому 4,5, і досліджувані мікроводорості не витримували цих кислотних умов зупинили поділ клітин.

## РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ КУЛЬТИВУВАННЯ CHLORELLA VULGARIS

Мікродорості виду *Chlorella vulgaris* широко поширені в природі та у дослідженнях. Даний вид досить стійкий до дії високих концентрацій забруднюючих речовин [121]. *C. vulgaris* має підвищену толерантність до концентрацій вуглекислого газу та характеризується достатньо високою швидкістю росту та фіксацією вуглекислого газу (приблизно 18% об'єму розчину до об'єму розчинника) [122].

Хлорела (*Chlorella*) відноситься до відділу *Chlorophyta* родини *Chlorellaceae* [123]. Одноклітинна зелена водорість без джгутиків та війок, містить одне дрібне ядро, може утворювати скупчення. Клітини даного виду мають сферичну форму, розміром до 10 мкм, прісноводні [124].

Рис.11. Проба мікродоростей *Chlorella vulgaris* у інокуляторі. Збільшення 400<sup>x</sup>



Для культивування *Chlorella vulgaris* використовували селективне поживне середовище Громова № 6.

Склад середовища (г/дм<sup>3</sup>): KNO<sub>3</sub> - 1,0; CaCl<sub>2</sub> - 0,15; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 0,2; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0,2; 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.

Культивування здійснювалось в циліндричному колонному фотобіореакторі ерліфтного типу з різними діаметрами дифузора (0,5 мм, 0,7 мм, 1мм, 1,5 мм та контроль з діаметром внутрішнього шлангу – 5мм), оскільки діаметр дифузора є одним з важливих параметрів росту мікроводоростей та збільшення розчиненого CO<sub>2</sub> у середовищі та дозволяє зменшити самозатінення мікроводоростей за допомогою перемішування культуральної рідини. Сумарна площа отворів реактору відповідає площі трубки. Діаметр колони 0,06 м. Відбір проб здійснювали через зливний клапан у днищі реактору. Діаметр труби ерліфту – 0,03м, всередині неї - шланг через який подається атмосферним повітрям (частка CO<sub>2</sub> рівна 250—450 ppm). Швидкість подачі вуглекислого газу (2 хв/добу) та атмосферного повітря – 0,6 дм<sup>3</sup>/хв.

При атмосферному тиску CO<sub>2</sub> погано розчиняється у рідині з утворенням вугільної кислоти, що володіє слабкими кислотними властивостями:



У водних розчинах - орто-форма вугільної кислоти (H<sub>4</sub>CO<sub>4</sub>). Слід зазначити, що активного утворення вугільної кислоти при контакті діоксиду вуглецю з водою не відбувається. Розчинена вугільна кислота швидко дисоціює. У вигляді кислоти у воді знаходиться лише до 0,1% CO<sub>2</sub>.

У воді при атмосферному тиску і 20°C розчинність становить близько 15 г/л. За законом Генрі-Дальтона розчинність газу при постійній температурі в рідині прямо пропорційна його парціальному тиску.

$$m = kp, \quad (3.2)$$

де  $m$  – маса газу, який розчиняється в 1 л розчинника;  $p$  – тиск газу (або парціальний тиск у разі суміші газів);  $k$  – коефіцієнт Генрі (для компонентів розчину = 1,08 при 20 °C).

$$m_{P1} = 1,75 \cdot 10^{-3}, \text{ г/л}_{\text{роз}}$$

$$m_{P2} = 0,972 \cdot 10^{-3}, \text{ г/л}_{\text{роз}}$$

$$m_{P3} = 0,08 \cdot 10^{-3}, \text{ г/л}_{\text{роз}}$$

$$m_{P4} = 0,432 \cdot 10^{-3}, \text{ г/л}_{\text{роз}}$$

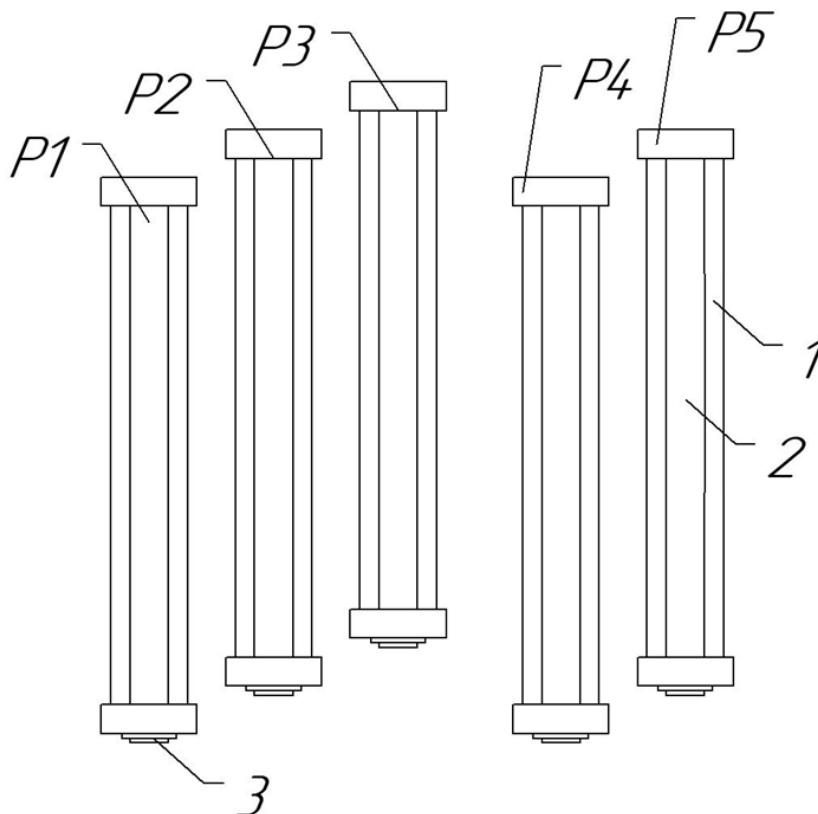
$$m_{P5} = 0,14 \cdot 10^{-3}, \text{ г/л}_{\text{роз}}$$

Згідно з отриманими результатами можна зробити висновок, що чим меншим є вихідна бульбашка газу, тим краще відбувається розчинність (Табл.5)

Табл.5. Показники розчинності (г/л) за добу CO<sub>2</sub> кожного реактору.

контроль	0,5 мм	0,7 мм	1 мм	1,5 мм
0,08*10 <sup>-3</sup>	1,75*10 <sup>-3</sup>	0,972*10 <sup>-3</sup>	0,432*10 <sup>-3</sup>	0,14*10 <sup>-3</sup>

Рис.12. Принципова схема розміщення фотобіореакторів:



1 – фотобіореактор; 2 – ерліфт; 3 – зливний клапан

Діаметр отворів дифузора: P1 (0,5 мм), P2 (0,7 мм), К (контроль, 5 мм, що є діаметром внутрішнього шлангу), P4 (1 мм), P5 (1,5мм).

Період культивування – 31 доба при кімнатній температурі (19-21°C). Для культивування використовувалось природне освітлення, довжина світлового дня - 8 годин.

Завантаження поживного середовища та інокуляту в фотобіореактор здійснювали вручну. Початкова оптична густина суміші інокуляту та поживного середовища  $D_{450}=0,350\pm 0,01$ .

Барботаже повітря, що використовували під час дослідження – атмосферне. Подача повітря для аерації відбувалось постійно також з метою постійного перемішування середовища. За добу аерації атмосферним повітрям (24 год.) 2 хв відбувалась подача чистого вуглекислого газу з метою дослідити його вплив на приріст біомаси.

Для визначення тривалості лаг-фази використовували інокулят вирощений на поживному середовищі Болда[124]. Пересів мікродоростей з поживного середовища здійснювався вручну, початкова оптична густина  $0,030\pm 0,005$ .

Приріст біомаси визначали вимірюванням оптичної густини спектрофотометром Ulab 102 (Китай), довжина хвилі - 450 нм [123], товщина скляної кювети – 1 см.

Застосування в аналізі методу спектрофотометрії, як і інших фотометричних методів, ґрунтується на використанні для визначення концентрацій речовин закону Бугера-Ламберта-Бера:

$$\lg(I_0/I) = \chi \cdot C \cdot l, \quad (3.3)$$

де  $I_0$  — інтенсивність електромагнітного випромінювання, що падає на розчин речовини;  $I$  — інтенсивність електромагнітного випромінювання, яке пройшло через розчин речовини;  $l$  — товщина шару розчину;  $C$  — концентрація розчину, що досліджується;  $\chi$  — показник поглинання розчину. Величину  $\lg(I_0/I)$  називають оптичною густиною. Її позначають буквами  $A$  або  $D$ .

Показник поглинання  $\chi$  — константа для кожної речовини при певній довжині хвилі світлового випромінювання. Вона дорівнює оптичній густині розчину з концентрацією та товщиною шару, що дорівнюють одиниці. Якщо концентрацію виражають у моль/дм<sup>3</sup>, то  $\chi$  позначають через  $\epsilon$  і називають молярним коефіцієнтом світлопоглинання (молярний коефіцієнт екстинкції). У разі, коли  $C$  — масооб’ємна концентрація, коефіцієнт  $\chi$  називають питомим коефіцієнтом світлопоглинання (питомим коефіцієнтом екстинкції) з відповідним позначенням .

Питому швидкість росту розраховували за формулою [125]:

$$\mu = \frac{\ln(x_k/x_0)}{(t_k-t_0)}, \text{ дїб}^{-1}, \quad (3.4)$$

де  $x_k$  - оптична густина в кінці культивування;

$x_0$  - оптична густина на початку культивування;

$t_k$  – остання доба культивування;

$t_0$  – нульова доба культивування.

Визначення рН поживного середовища та культуральної рідини здійснювали рН-метром SX 811 згідно з інструкції (табл.5). Мікроскопічне дослідження культури *Chlorella vulgaris* здійснювали за використання мікроскопа ТМ XSP-139TP (Ulab, Китай). Отримані значення обробляли за використання Microsoft Excel.

Табл.6. Середні значення рН середовища станом на перший та останній день культивування (кожне значення є середньою величиною трьох повторностей).

Контроль	P1	P2	P4	P5	Значення рН для сер. Громова 6
Перший день культивування					
5,26	5,1	5,22	5,26	5,19	4,92
Останній день культивування					
4,99	4,5	4,95	5,1	5,07	



## Висновки до розділу 2

1. Обраний фотобіореактор ерліфтного типу з різними діаметрами отворів дифузора дозволяє дослідити вплив різного вмісту атмосферного повітря з масою розчиненого  $\text{CO}_2$  в 5 реакторах 8,7 мг/л (або молярна маса  $2,7 \cdot 10^{-3}$  моль/л.).

2. Селективне середовище Громова №6 у поєднанні з особливостями будови реактора зменшує ризики контамінації культуральної рідини.

3. Для аналізу культуральної рідини та приросту біомаси обрано спектрофотометричний метод, рН-метрію та мікроскопію.

4. Час подачі чистого вуглекислого газу становить 2 хв на добу з метою зменшення ризику сильного підкислення середовища.

5. Для проведення дослідження впливу  $\text{CO}_2$  на приріст біомаси обрано діаметри отворів дифузора: P1 (0,5 мм), P2 (0,7 мм), P3 (контроль, 5 мм, що є діаметром внутрішнього шлангу), P4 (1 мм), P5 (1,5мм).

6. Розчинність  $\text{CO}_2$  у середовищі становить P1= $1,75 \cdot 10^{-3}$  г/л, P2= $0,972 \cdot 10^{-3}$  г/л, P3(контроль)=  $0,08 \cdot 10^{-3}$  г/л, P4= $0,432 \cdot 10^{-3}$  г/л, P5= $0,14 \cdot 10^{-3}$  г/л.

## РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ РОБОТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

### 3.1 Культивування *Chlorella vulgaris* в фотобіореакторах ерліфтного типу.

Аерація є одним з ключових параметрів при культивуванні мікроводоростей, оскільки вирішує питання перемішування культуральної рідини, запобігає самозатінення та осадження мікроводоростей та дозволяє гомогенізувати поживне середовище та мінімізувати градієнт температур усередині фотобіореактора. Газообмін з навколишнім середовищем також є важливим у аерації культуральної рідини. [126]

Менший розмір дифузора дозволяє отримати бульбашки меншого діаметру на початку утворення, при проходженні через стовп рідини бульбашка збільшується в розмірі. При інших однакових умовах менший діаметр бульбашки дозволяє збільшити поверхню газообміну між бульбашками та рідинною, а отже і збільшити концентрацію розчиненого CO<sub>2</sub> в культуральній рідині.

Рис. 13. Фотобіореактор під час культивування *Chlorella vulgaris*.



а

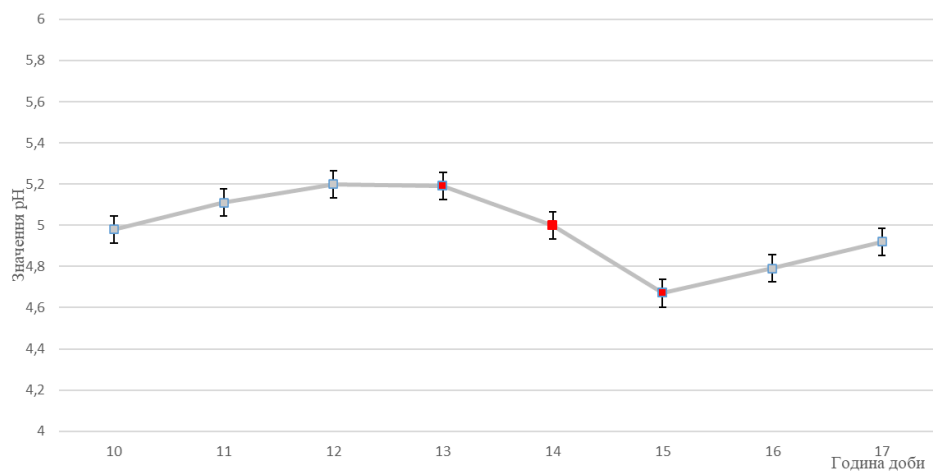
б

а - 1-ша доба культивування; б – 31-ша доба культивування

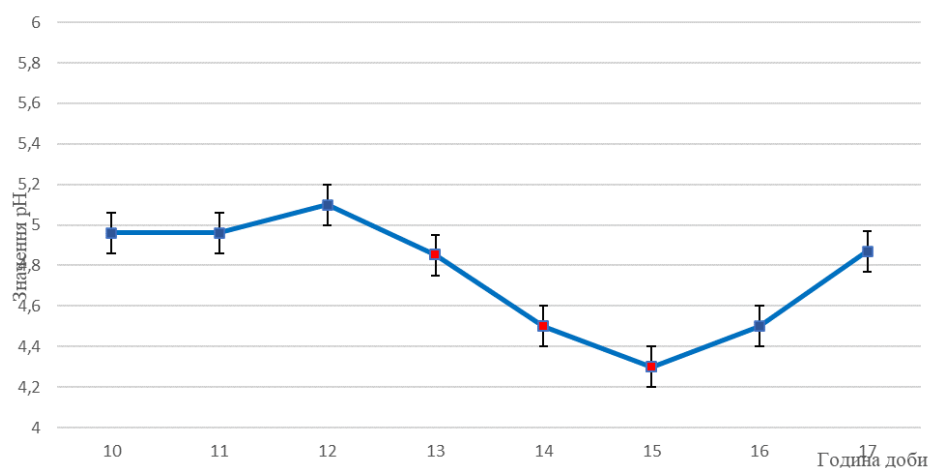
Відповідно до значень рН середовища станом на перший, 6, 12, 24 та останній дні культивування (кожне значення є середньою величиною трьох повторностей) було визначено динаміку спаду рівня рН у середовищі під впливом постійної аерації барботажем повітрям та чистим CO<sub>2</sub> протягом 2 хв/день (рис.14.)

Рис.14. Динаміка рівня рН у середовищі протягом 14 доби культивування для *а* - контроль, *б* -0,5 мм, *в*- 0,7 мм, *г* – 1 мм та *д*- 1,5 мм відповідно. Час подачі чистого CO<sub>2</sub> – 2 хв.

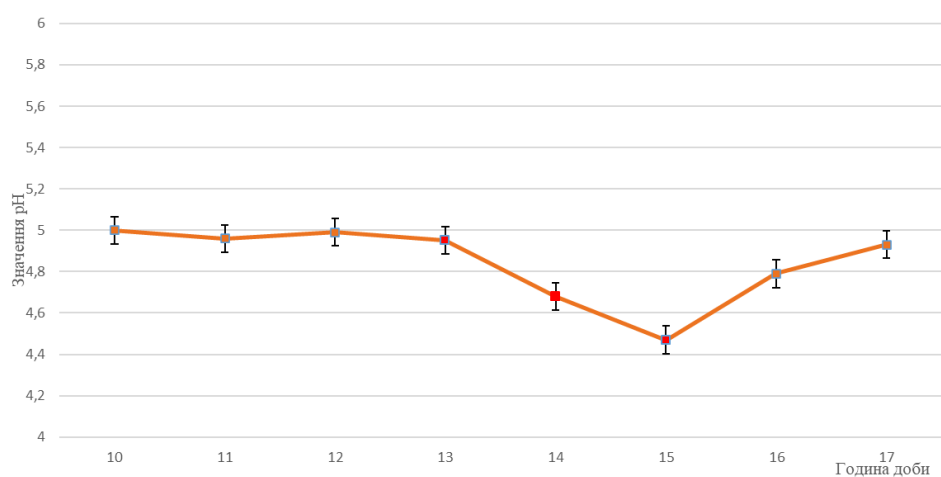
*а*



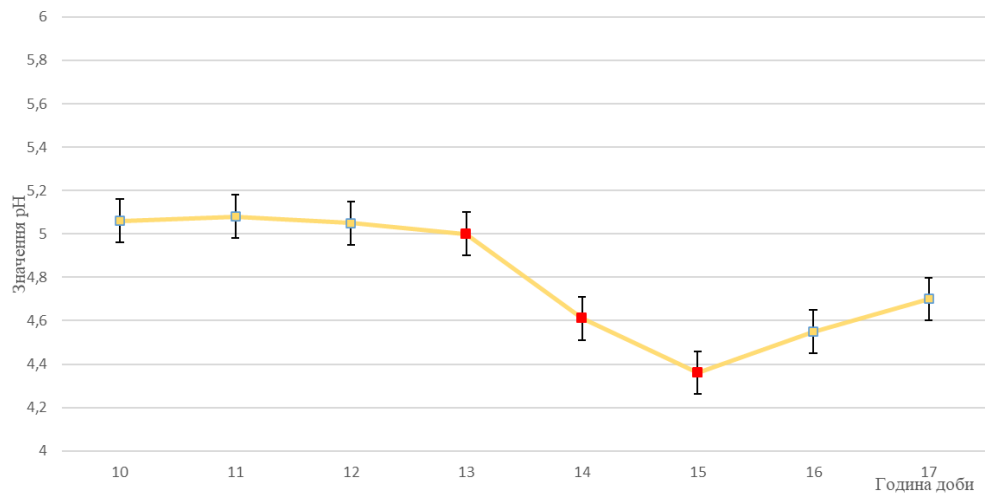
*б*



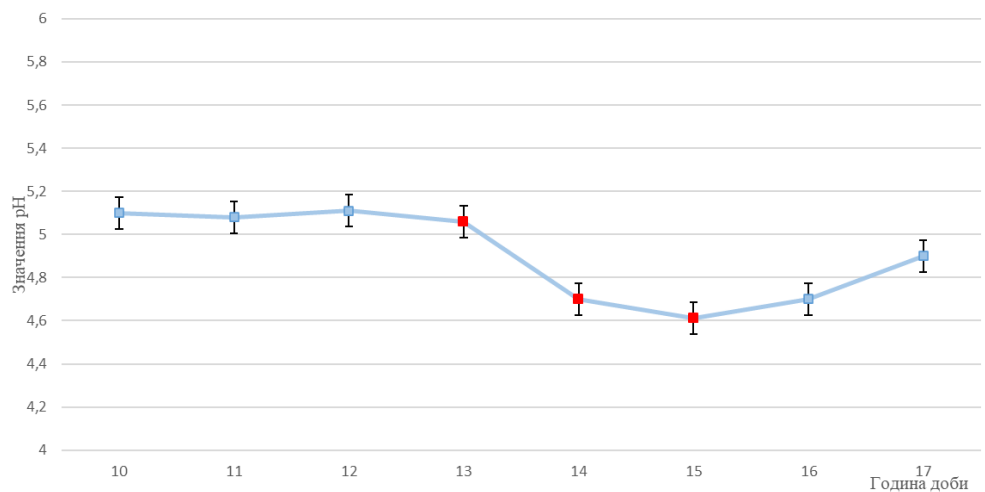
*в*



с



д



Результати приросту біомаси на основі оцінки оптичної густини показали, найменший приріст біомаси у фотобіореакторі з Р3 та Р5 – контроль (5 мм) та реактор з діаметром отворів дифузора 1,5 мм відповідно (Рис. 14. та Рис. 15.), що вказує на те, що мала концентрація розчиненого вуглекислого газу пригнічує приріст біомаси. Різкий приріст біомаси у першій половині культивування (різке збільшення значень оптичної густини) спостерігається в фотобіореакторах Р2 та Р4 з діаметрами дифузора 0,7 та 1 мм відповідно. Найбільший приріст біомаси та на прикінці культивування спостерігали в фотобіореакторі з діаметром дифузора 0,7 мм. Також високі значення оптичної густини спостерігали в фотобіореакторі з діаметром дифузора 1 мм. Низькі концентрації біомаси були характерними для Р5 та Р3 у зв'язку з зміною

розчиненого вуглекислого газу та зміною інтенсивності перемішування культурного середовища у зв'язку з різним об'ємом та площею поверхні бульбашок. P1 з найменшим діаметром отворів дифузора (0,5 мм) показав середній результат. Не зважаючи на більш активну розчинність CO<sub>2</sub> у середовищі завдяки малим бульбашкам на виході з дифузора, це призводить до підкислення середовища, що призупиняє поділ клітин біомаси.

Рис. 14. Зміна оптичної густини (D<sub>450</sub>) культуральної рідини протягом культивування 1 *Chlorella vulgaris* в фотобіореакторі ерліфтного типу з різними діаметрами дифузора. Діаметр отворів дифузора: P1 - 0,5 мм, P2 - 0,7 мм, P5 – 1 мм, P4 - 1,5мм, P3 - контроль, 5 мм – діаметр внутрішнього шлангу.

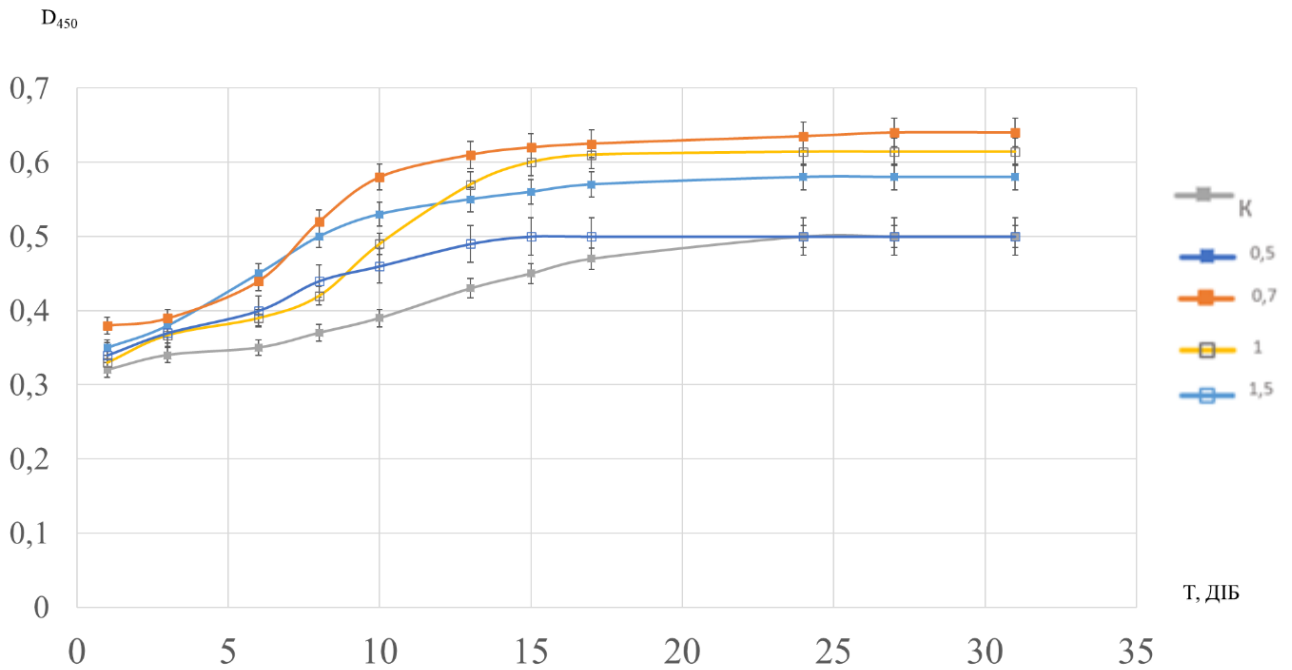
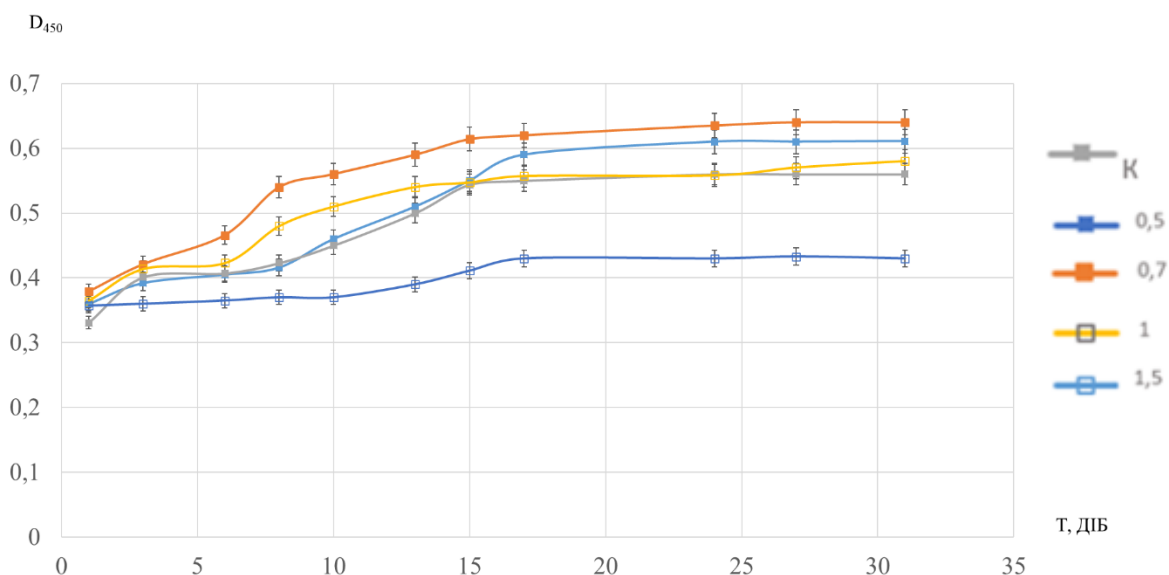


Рис. 15. Зміна оптичної густини (D450) культуральної рідини протягом Культивування 2 *Chlorella vulgaris* в фотобіореакторі ерліфтного типу з різними діаметрами дифузора. Діаметр отворів дифузора: P1 - 0,5 мм, P2 - 0,7 мм, P5 – 1 мм, P4 - 1,5мм, P3 - контроль, 5 мм – діаметр внутрішнього шлангу.



Розраховано середню питому швидкість (середнє значення питомої швидкості приросту біомаси у кожному реакторі при культивуванні 1 та 2) протягом 8 дбб, 24 дбб та протягом всієї тривалості культивування. Найбільша питома швидкість росту біомаси мікроводоростей *Chlorella vulgaris* спостерігалась у фотобіореакторі (крім P5) протягом 24 дбб та становила 0,02дбб<sup>-1</sup>. Приріст у фотобіореакторі з діаметром отворів дифузора 0,7 мм (P2) 0,04 дбб<sup>-1</sup> протягом 8 дбб є найбільшим значенням..

P2, P3 та P5 за своїми показниками середньої питомої швидкості є найбільш характерними логарифмічному графіку приросту біомаси.

Табл. 6. Середня питома швидкість росту мікроводоростей *Chlorella vulgaris* Культивування 1 та 2.

Тривалість культивування, дбб	Питома швидкість росту, дбб <sup>-1</sup>				
	P1 (0,5мм)	P2 (0,7мм)	P3 (5мм)	P4 (1,0мм)	P5 (1,5мм)
8	0,02	0,04	0,03	0,03	0,04

24	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
31	0,017	0,017	0,016	0,015	0,013

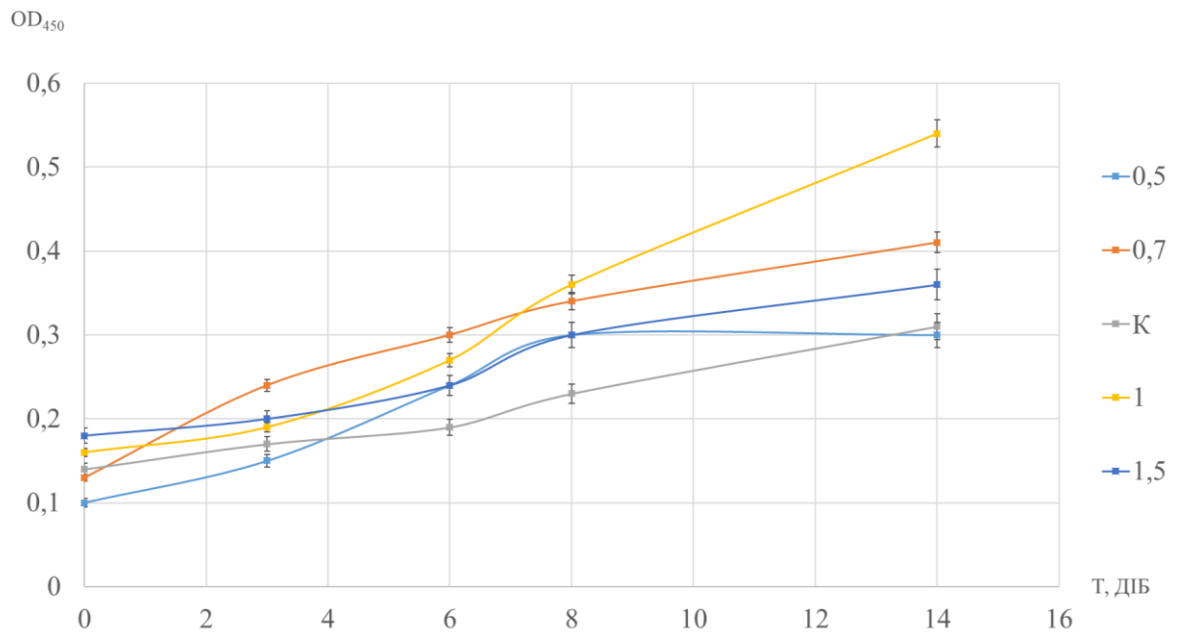
### 3.2. Вплив діаметру дифузора на тривалість лаг-фази при культивуванні біомаси *Chlorella vulgaris* при зміні поживного середовища.

Культивування та підтримування музейних культур може відбуватись в селективних поживних середовищах відмінних від тих, які обрані для промислового культивування. Вплив аерації на тривалість лаг-фази при культивуванні біомаси *Chlorella vulgaris* досліджували протягом 14 діб при Культивуванні 3.

Тривалість лаг-фази коливається від 8 до 10 діб. Спостерігали найбільш швидкий приріст біомаси при культивування у фотобіореакторі з діаметром отворів дифузора – 1 мм (P4). При культивуванні з більш широкими отворами дифузора 1,5 (P5) та контроль 5 мм (P3) спостерігали меншу порівняно з P4 швидкість росту мікроводоростей. У фотобіореакторах з діаметром отворів дифузора 0,5 мм (P1) та 0,7 мм (P2) не відбувається збільшення оптичної густини протягом 14 діб.

Значення рН культуральної рідини  $5,26 \pm 0,1$ , що більше за рН селективного поживного середовища Громова №6 4,92. Причиною зростання рН є метаболізм мікроводоростей, зокрема споживання речовин поживного середовища.

Рис. 16. Зміна оптичної густини (D450) культуральної рідини протягом лаг-фази культивування 3 *Chlorella vulgaris* в фотобіореакторі ерліфтного типу з різними діаметрами отворів дифузора. Діаметр отворів дифузора: P1 - 0,5 мм, P2 - 0,7 мм, P4 - 1 мм, P5 - 1,5мм, P3 - контроль, 5 мм – діаметр внутрішнього шлангу.



При мікроскопіюванні спостерігається тенденція до утворення скупчення мікроводоростями.

Рис.17. Проба мікроводоростей *Chlorella vulgaris* у фотобіореакторі. Збільшення 400<sup>x</sup>.



Найбільша питома швидкість росту мікроводоростей протягом лаг-фази в фотобіореакторі P4 та P2 та становили 0,086 діб<sup>-1</sup> 0,082 діб<sup>-1</sup> відповідно. В фотобіореакторі P3 спостерігався найменший ріст біомаси. Такі результати свідчать про те, що аерація у фотобіореакторах ерліфтного типу з діаметром отворів дифузора 1,0 мм та 0,7 мм забезпечує мікроводорості при зміні



поживного середовища вуглекислим газом та перемішуванням краще, порівняно з фотобіореакторами з меншим діаметром отворів дифузора.

Табл. 7. Питома швидкість росту мікроводоростей *Chlorella vulgaris* протягом лаг-фази при Культивуванні 3 (Квітень 2021).

Тривалість культивування, діб	Питома швидкість росту, діб <sup>-1</sup>				
	P1 (0,5мм)	P2 (0,7мм)	P3 (5мм)	P4 (1,0мм)	P5 (1,5мм)
14	0,078	0,082	0,056	0,086	0,049

При культивуванні 3 було визначено кількість клітин у кожному з реакторів за допомогою приладу Countess 2 fl з двома флуоресцентними каналами, що призначений для підрахунку концентрації, співвідношення живих/мертвих клітин в трипановим синьому, а також оцінки ефективності трансфекції клітин.

Рис.18. Прилад Countess 2 fl для визначення кількості живих та мертвих клітин.[ 127]

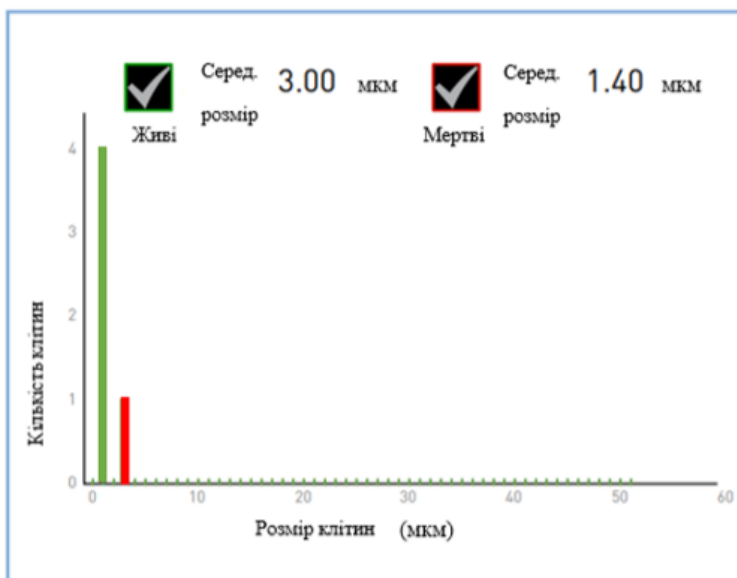


Рис.19. Співвідношення живих та мертвих клітин в Р1 під час останньої серії дослідів.

## Countess II ЖИВИ ТА МЕРТВІ КЛІТИНИ

### Результати:

	Концентрація	
Всього		$3.52 \times 10^4$ , мЛ
Мертві	17%	$5.86 \times 10^3$ , мЛ
Живі	83%	$2.93 \times 10^4$ , мЛ



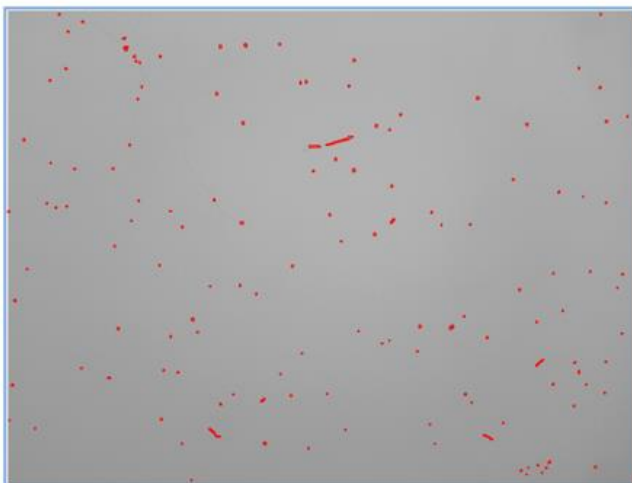
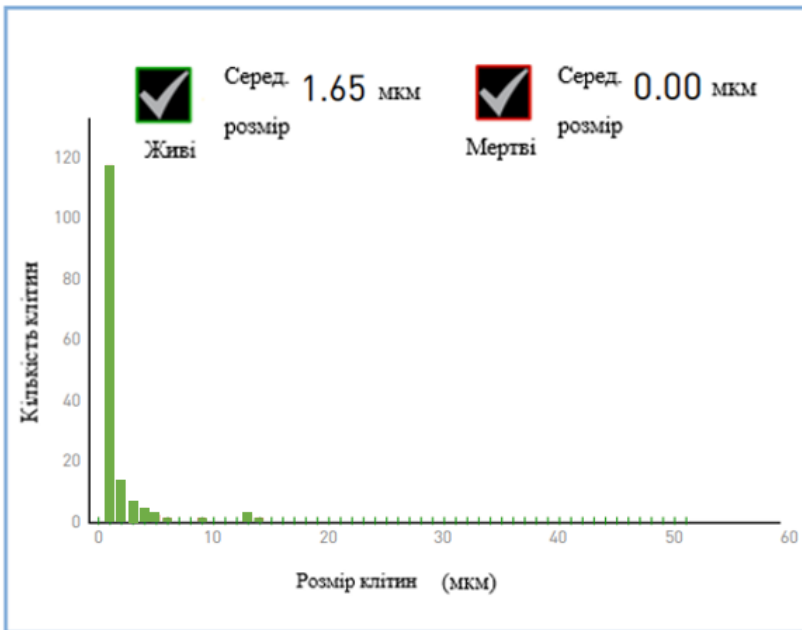
Автоосвітлення: вкл	Живі	Мертві
Розмір:	0,60	0,60
Яскравість:	0,255	0,255
Циркуляція:	0,80	0,60

Рис.20. Співвідношення живих та мертвих клітин в Р2 під час останньої серії дослідів.

## Countess II ЖИВІ ТА МЕРТВІ КЛІТИНИ

Результати:

	Концентрація	
Всього	8.62 x 10 <sup>5</sup> /мл	
Мертві	0%	0.00 x 10 <sup>0</sup> /мл
Живі	100%	8.62 x 10 <sup>5</sup> /мл



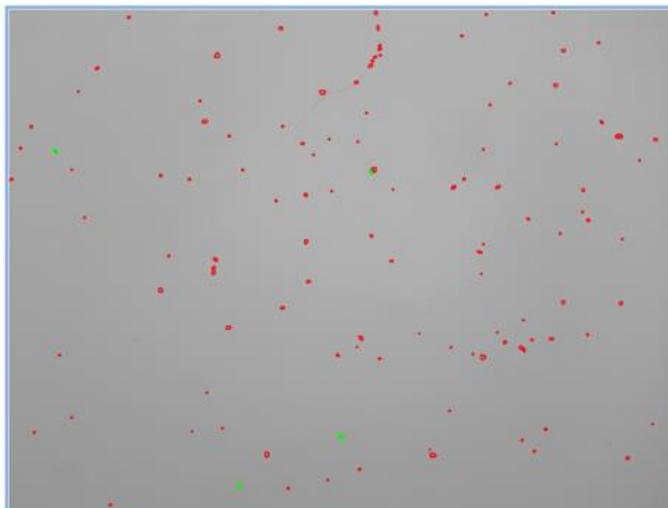
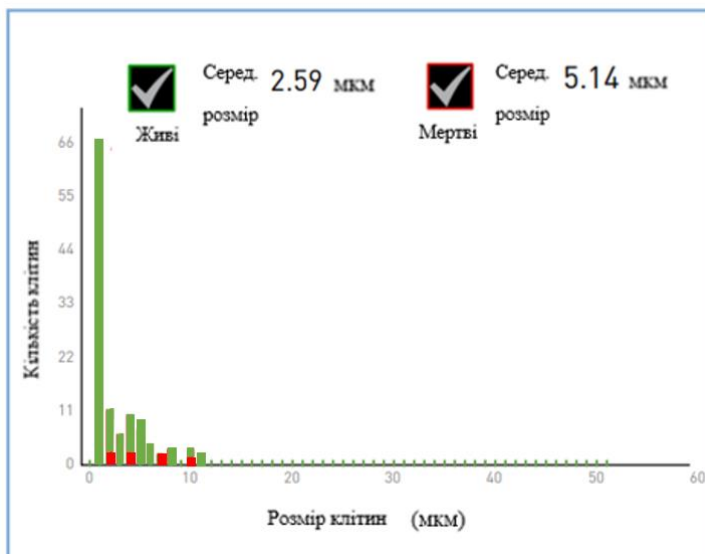
Авт. освітлення: вкл	Живі	Мертві
Розмір:	0,60	0,60
Яскравість:	0,255	0,255
Циркуляція:	0.58	0.24

Рис.21. Співвідношення живих та мертвих клітин в РЗ (контроль) під час останньої серії дослідів.

## Countess II ЖИВІ ТА МЕРТВІ КЛІТИНИ

Результати:

	Концентрація	
Всього		$7.10 \times 10^5/\text{мл}$
Мертві	6%	$4.11 \times 10^4/\text{мл}$
Живі	94%	$6.69 \times 10^5/\text{мл}$



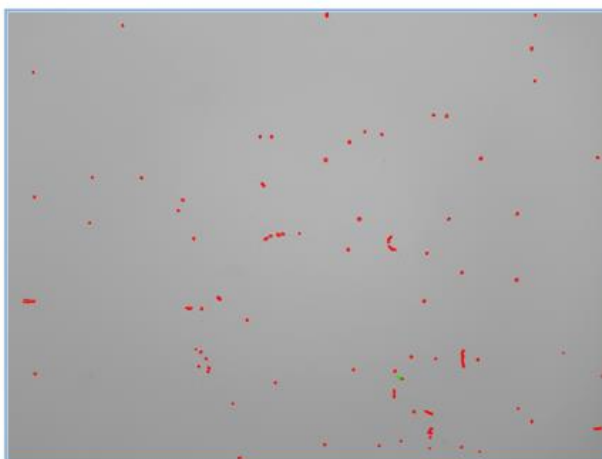
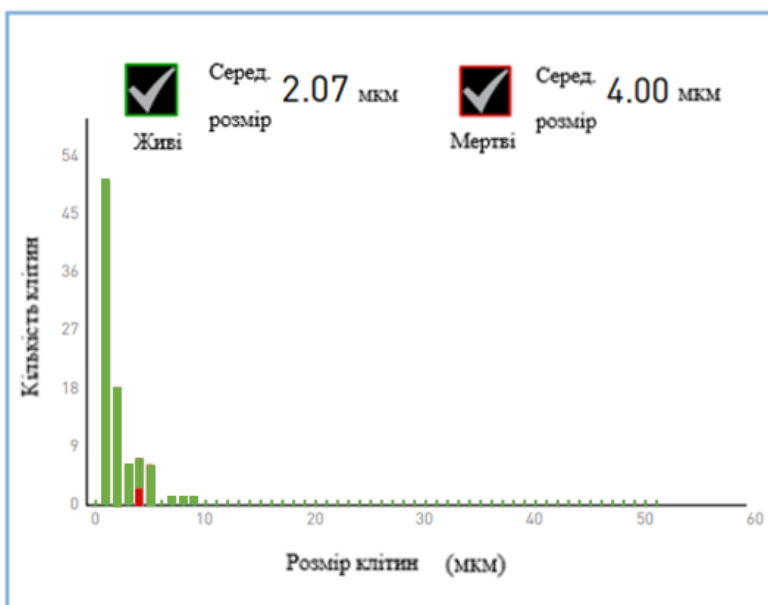
<u>Авт. освітлення: ВКД</u>		Живі	Мертві
	Розмір:	0,60	0,60
	Яскравість:	0,255	0,255
	Циркуляція:	0.58	0.52

Рис.22. Співвідношення живих та мертвих клітин в Р4 під час останньої серії дослідів.

## Countess II ЖИВІ ТА МЕРТВІ КЛІТИНИ

Результати:

Концентрація	
Всього	$5.34 \times 10^5/\text{мл}$
Мертві	1% $5.86 \times 10^3/\text{мл}$
Живі	99% $5.28 \times 10^5/\text{мл}$



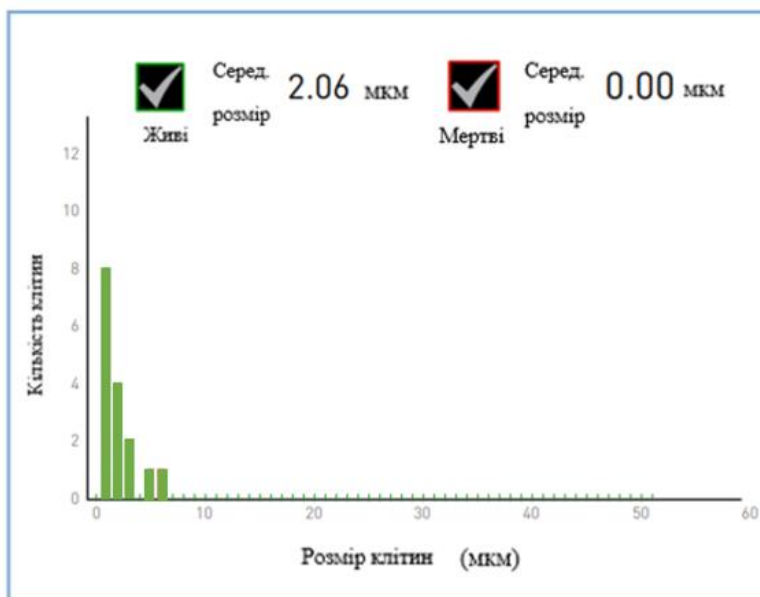
Авт. освітлення: вкл	Живі	Мертві
Розмір:	0,60	0,60
Яскравість:	0,255	0,255
Циркуляція:	0,73	0,46

Рис.23. Співвідношення живих та мертвих клітин в Р5 під час останньої серії дослідів.

### Countess II ЖИВИ ТА МЕРТВІ КЛІТИНИ

Результати:

	Концентрація	
Всього		$9.38 \times 10^4$ /мл
Мертві	0%	$0.00 \times 10^0$ /мл
Живі	100%	$9.38 \times 10^4$ /мл



<u>Авт. освітлення: вкл.</u>		Живі	Мертві
	Розмір:	0,60	0,60
	Яскравість:	0,255	0,255
	Циркуляція:	0.80	0.61

Було проведено дослідження впливу CO<sub>2</sub> на приріст біомаси *Chlorella vulgaris* шляхом подачі атмосферного повітря для аерації середовища с досліджуваними мікродостями та 2 хвилинами подачі чистого вуглекислого газу до фотобіореактору ерліфтного типу, що складається з 4 скляних циліндрів з різними діаметрами дифузора (0,5 мм, 0,7 мм, 1мм, 1,5 мм) та циліндру-контролю з діаметром внутрішнього шлангу 5 мм.

Найбільш високі значення приросту біомаси (відповідно до значень оптичної густини):

1. P1 з діаметром дифузора 0,5мм: 0,58
2. P2 з діаметром дифузора 0,7 мм: 0,64
3. P3 (контроль) і загальним діаметром внутрішнього шлангу 5 мм: 0,5
4. P4 з діаметром дифузора 1 мм: 0,614
5. P5 з діаметром дифузора 1,5мм: 0,5

Було проведено 3 культивування, завдяки яким було зроблено висновок, що завдяки використанню діаметрів дифузору 0,7 мм та 1 мм ми отримали найкращі результати при заданих умовах протягом усього періоду культивування. При використанні діаметру саме 0,7 мм можна отримати найбільші значення приросту біомаси хлорелли за більш короткий період культивування (зниження періоду культивування є перевагою для впровадженні технології у промисловості).

Отже, можна зробити висновок, що використання діаметру дифузору 0,7 мм для культивування *Chlorella vulgaris* в ерліфтному біореакторі є найбільш раціональним через найвищі показники приросту біомаси.

## РОЗДІЛ 4. РОЗРОБЛЕННЯ СТАРТАП-ПРОЄКТУ

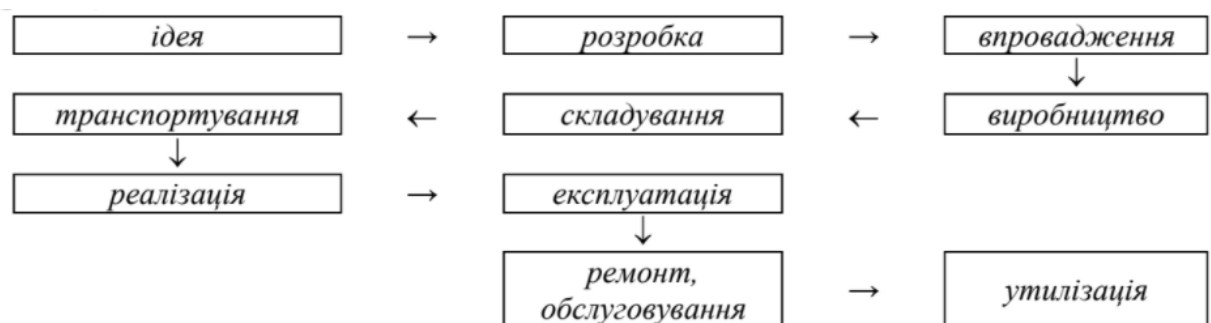
### 4.1. Резюме: конкретизація бізнес-ідеї, мети стартапу, об'єкту дослідження, місця розробки у інноваційному ланцюжку цінності .

Темою проєкту є дослідження впливу умов подачі CO<sub>2</sub> на приріст біомаси *Chlorella vulgaris* з метою знайти найбільш раціональний діаметр дифузора для подачі барботажного повітря у реактор для подальшого перемішування біомаси з середовищем та аерації.

Згідно з Рис.24., даний проєкт можна вважати проміжним етапом між розробкою та впровадженням, адже цінність роботи визначається детальним дослідженням одного з параметрів культивування мікроводоростей. Даний параметр є одним з факторів впливу на отримання продукту-сировини, що містить у собі певні характеристики саме цільового продукту – ліпідів.

Так як CO<sub>2</sub> не є параметром, що впливає на отримання більшої кількості ліпідів у *Chlorella vulgaris* після культивування, робота не може напряду нести у собі цінність в розробці цільового продукту, проте має вплив саме на розвиток сировини (мікроводоростей) та її кількості (біомаси). Саме тому цінність формується у вигляді «розробки оптимального параметру для подальшого впровадження».

Рис.24. Інноваційний ланцюжок цінності.



**Ціль** проєкту:

- 1) Першоступенева ціль – визначити, при якому діаметрі дифузора можна отримати найбільший приріст біомаси *Chlorella vulgaris* за інших однакових параметрів.



2) Глобальна ціль – створити поняття «стандартних» параметрів для подальшого вивчення виду мікроводоростей при їх культивуванні, а також при використанні отриманих результатів для промислового виробництва біодизелю з досліджуваного виду мікроводоростей.

При проведенні порівняльного дослідження культивування водорості *Chlorella vulgaris* за різних умов барботування, що являють собою різні діаметри дифузора, ми визначали раціональні розміри дифузора за допомогою величин приросту біомаси, що дозволяє сформулювати такий об'єкт та предмет дослідження:

**Об'єкт дослідження** - процес культивування мікроводоростей в лабораторному біореакторі ерліфтного типу з різними діаметрами дифузора з подачею атмосферного повітря.

**Предмет дослідження** - раціональні розміри дифузора у лабораторному ерліфтному реакторі та подальший вплив CO<sub>2</sub> в залежності від його подачі у середовище з біомасою .

Відповідно до інформації, вказаної вище можна скласти наступне резюме проєкту:

Табл.8. Резюме стартап-проєкту.

Показник	Характеристика
1. Сутність ідеї	Вирощування <i>Chlorella vulgaris</i> для подальшого отримання біодизельного палива за використання раціонального діаметру дифузора при аерації, згідно з отриманими даними.
2. Наявність аналогів або прототипів ідеї	<b>Прототипи:</b> дифузори для таких же цілей з іншими значеннями діаметрів.

	<b>Аналоги:</b> подібні проекти по культивуванні.
3. Основна потреба, яку задовольнить реалізований стартап	заміна традиційного палива, знищення конкуренції з сільськогосподарською діяльністю (глобальна)
4. Ступінь розробленості технології реалізації	на стадії досліджень щодо ефективності, дешевизни та можливостей впровадження.
5. Класифікація продукту стартапу за міжнародною класифікацією товарів	клас №4 за класифікацією МКТП, який описує технічні мастила, палива.
6. КВЕД, до якого може належати дане виробництво	клас 20.59: Виробництво іншої хімічної продукції, н.в.і.у.  виробництво біопалива з складних ефірів жирних кислот, що їх одержують з рослинних олій або тваринних жирів (наприклад, виробництво біодизелю)
7. Очікувана потужність стартапу	мале підприємство
8. За масштабом виробництва	одиничне виробництво або інтеграція.
9. За рівнем спеціалізації	комбіноване
10. За ресурсами, що споживатимуться	матеріаломістке

11. За чисельністю персоналу	мале – до 50 осіб
12. Органи управління при реалізації стартапу	національні/з іноземними інвестиціями.
13. Бажане географічне розташування  - потужностей стартапу;  - офісу стартапу;  - збутової мережі;  - постачальників комплектуючих.	територія України та Європи.
14. Місце ідеї у ланцюжку цінностей інноваційного процесу	розробка
15. Гранична корисність ідеї стартапу	при відмові від цього товару споживач втратить можливість користуватися біопаливом.
16. Бізнес-модель стартапу	B2B (B2C можливе лише за умов досвіду B2B).
17. Конкуренти вітчизняні (ціна, на якому етапі реалізації знаходяться, основні конкурентні переваги, фактори успіху)	ОРГАНІК ДНІПРО, Дніпро, Україна - виробники біодизелю з інших ресурсів (ріпак, соняшникова олія, тощо) – малі підприємства (ціна залежить від переговорів та потреб) .

18. Конкуренти іноземні (ціна, на якому етапі реалізації знаходяться, основні конкурентні переваги, фактори успіху)	Аналог ALGAE BIODIESEL, Стамбул, Туреччина – знаходиться на такому ж рівні досліджень для майбутнього впровадження. Ціна на даному етапі відсутня (приблизно 100-140 грн).
19. Ключові фактори успіху стартапу	ціна, сервісне обслуговування, інвестування, результативність подальших досліджень.
20. Споживачі (основні на етапі впровадження, групи, орієнтовна чисельність)	дистриб'ютори -АЗС станції.
21. Планова кількість продукту розробки для першого етапу реалізації	100 000 літрів.
22. Мінімальна кількість виробництва за методом точки беззбитковості	12-15 тис.літрів в місяць
23. Споживачі на етапі розвитку	АЗС, офіційні дистриб'ютори рідкого пального
24. Споживачі на етапі зрілості	всі групи фізичних та юридичних осіб.
25. Конкурентна ціна на продукт стартапу	58 грн/л

26. Плановий рівень рентабельності при реалізації продукту	120%
27. Капіталовкладення в проект	при впровадженні проекту у масове виробництво, промисловість складають 2 450 000 грн.
28. Період повернення капіталовкладень у проект	48 місяців
29. Джерела фінансування	зовнішні
30. Основні компоненти продукції стартапу:	штам водоростей, реактори для культивації, компоненти поживного середовища, світлодіоди, датчики для виміру різних параметрів, земельна ділянка для влаштування реакторів.
31. Потенційні постачальники:	ТОВ «Стеллар» - реактори та його компоненти, Київ, ТОВ «Ковалент» - хімічні реактиви, Львів.
32. Планове місце реалізації результату розробки:	місто Київ, Україна.
33. Посередники	інвестори з країн Азії та Європи, або українські середні та великі промислові/енергетичні підприємства (для інтеграції у власне виробництво).

34. Методи просування результатів розробки на ринок:	ЗМІ, реклама у соціальних мережах.
35. Суб'єкт замовлення:	підприємства

#### 4.2. Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища стартапу.

Табл. 9. Аналіз загроз і можливостей зовнішнього середовища .

	Загрози	Можливості
<b>Економіка</b>		
	Постійна конкуренція з традиційним пальним на ринку може вплинути на продажі продукту	Продукт є унікальним та може зайняти окрему нішу на енергетичному ринку
2.	Економічна оцінка повинна містити всю біопереробну методику, тому готовність платити за товари і допускати вплив на навколишнє середовище є частиною процесу прийняття рішень.	Можливість позитивного впливу на економіку країни, за рахунок впровадження нового товару для експорту
3.	При іноземному інвестуванні є ризик втратити незалежність у веденні проєкту та його розробки	Іноземні інвестиції дозволяють пришвидшити процес впровадження технології
<b>Політика</b>		
1.	Байдужість політичних діячів (на найвищих посадах) та постійна корупція (від постачальників традиційного пального) може затримувати або навіть зупинити розвиток зеленого палива в Україні	CO <sub>2</sub> є важливим компонентом димових газів і служить причиною глобального потепління через парниковий ефект, тому біодизель є одним з шляхів покращення екологічної політики та впровадження нових законопроєктів щодо зменшення викидів CO <sub>2</sub>
<b>Науково-технічний прогрес</b>		
1.	Необхідно проводити додаткові дослідження, що триває декілька років. Можуть з'явитися нові конкуренти з більш швидким виходом на ринок, при цьому зайнявши позицію лідера та «Першість» (за теорією брендінгу).	Додаткові роки для досліджень можуть допомогти створити більш якісний кінцевий продукт, порівняно к продуктом, що впроваджується у виробництво без впевненості у всіх технологічних параметрах

2.	Утилізація і спалювання відходів біомаси мікроводоростей, що залишилися після виділення метаболітів, призводить до забруднення.	Можливість створення комплексу екологічних та біотехнологічних технологій для «після-виробничих» процесів для створення повністю екологічного кінцевого продукту
<b>Демографія</b>		
1.	Втрачається каста споживачів «традиціоналістів», які не стануть переплачувати за екологічне паливо у разі існування традиційного	Зростаючий інтерес населення до раціонального харчування та здорового способу життя поступово приведе до сприяння використання екологічного палива за необхідність

Табл. 10. Аналіз факторів зовнішнього оперативного середовища.

<b>Фактор</b>	<b>Переваги</b>	<b>Недоліки</b>
<i>Конкуренти (лише прототипи)</i>  ALGAE BIODIESEL	Пішли далі у своїх дослідженнях, вже мають перші спроби впровадження у промислове виробництво	1. Не є популярними у своїй країні (Туреччині) 2. Мають вищу ціну на продукт порівняно з нашою
<i>Постачальники</i>  1. ТОВ «Стеллар» - реактори та його компоненти, Київ, 2. ТОВ «Ковалент» - хімічні реактиви, Львів.	1. Зручне розташування (Київ), демократичні ціни 2. Демократичні ціни, є можливість довгострокового партнерства	1. Обмеженість в індивідуальних параметрах обладнання 2. Втрати грошей та часу на перевезення реактивів у Київ

Табл. 11. Переваги і недоліки внутрішнього середовища.

Переваги	Недоліки
Фактори – Постачальник, Виробник	

Екологічність отриманого продукту, можливість створення нового напрямку на енергетичному ринку.	Незавершенність в області досліджень та результатів. Багатокомпонентність у питаннях для досліджень, необхідних для впровадження
<b>Фактор - Споживач</b>	
В майбутньому – державні установи, комунальні підприємства, як споживачі. Використання в майбутньому водоростей також для фармацевтичної та косметичної галузей (можливо і в межах одного підприємства-виробника). Вплив на трендовість	Необізнаність у темі. Незацікавленість через високі вкладення. Незавершенність в області досліджень та результатів.
<b>Фактор - Посередники</b>	
Додаткові ресурси та бюджет. Можливість прискорення досліджень	Збільшення вартості цільового продукту та можлива втрата незалежності у виробництві.
<b>Фактор - Конкуренти</b>	
Переваги водоростей перед продуктами-ресурсами конкурентів як в плані ефективності цільового продукту, так і в плані соціально-політичних питань.	У конкурентів вже діючі виробництва та готові проекти.

Табл. 12. Аналіз зацікавлених сторін.

<b>Зацікавлена сторона</b>	<b>Вплив її на реалізацію проекту</b>	<b>Цікавість її до проекту</b>	<b>Загальний коефіцієнт впливу на проект</b>
<b>Суб'єкти зовнішнього оперативного середовища</b>			



Виробник	55%	80%	0,675
Постачальник	5%	1%	0,03
Споживачі	0%	1%	0,005
Посередники	40%	18%	0,29
Зовнішнє середовище			
Політичні структури	2%	2%	0,002
Суб'єкти економічного середовища	5%	20%	0,125
Власники географічних об'єктів	15%	10%	0,125
Суб'єкти демографії	8%	9%	0,085
Суб'єкти культурного середовища	0%	1%	0,005
Суб'єкти НТП	70%	60%	0,65

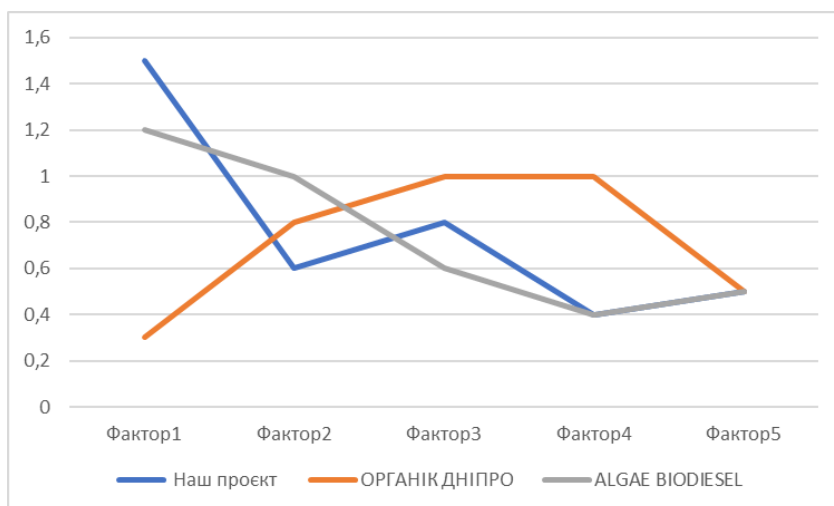
#### 4.3. Визначення ключових факторів успіху проекту .

Для більш наглядної оцінки технічного рівня продукту проектуванні і аналогів, а також для більшої об'єктивності оцінки порівняємо дані готового товару методом Шонфільда.

Табл. 13. Визначення ключових факторів успіху проекту методом Шонфільда.

№	Характеристики	Вагомість характеристик	Наш проект	ОРГАНІК ДНІПРО, Україна	ALGAE BIODIESEL, Стамбул, Турція
1	Ефективність готового продукту	0,3	5	1	4
2	Обладнання	0,2	3	4	5
3	Ціна	0,2	4	5	3
4	Стадія досліджень	0,2	2	5	2
5	Дотримання умов нормативної документації	0,1	5	5	5

Рис.25. Аналіз ключових факторів успіху проекту у вигляді діаграми Шонфільда.



Фактором успіху є ефективність цільового продукту, проте інші фактори можна покращити за допомогою фінансування.

Табл. 14. Варіанти розвитку ідеї стартапу.

<b>Варіант</b>	<b>Стислий опис можливого розвитку</b>
Впровадження у готове виробництво	Зникає необхідність у більшості обладнання, а більшість ресурсів береться з виробництва
Викуп патентів подібних досліджень, що також є методами покращення технології	Дозволяє створити інформаційну базу для отримання найраціональніших результатів

#### 4.4. Визначення потенційних споживачів.

Табл. 15. Класифікація потенційних споживачів.

1. Вік	Від 18-ти років Середній вік 21-60 років
2. За сплатоспроможністю	Від середнього класу
3. За соціальним рівнем споживачів	Рівень зарплати від 20 тис.грн
4. За способом життя (звички, традиції, стереотипи поведінки)	Наявність авто, обізнаність в екології, слідування за трендами
5. Тип особистості споживачів	Оптиміст, сангвінік
6. За ставленням до товару 1) Мотивація придбання 2) Ставлення до товару 3) Інформованість про товар 4) Інтенсивність споживання товару	Потреба в переході на біопаливо через значні викиди Позитивне ставлення ЗМІ Під час заправки авто
6. За сімейними цінностями	Не має значення
7. За інтенсивністю споживання товару	Раз у 3-10 днів в залежності від використання авто
8. За інформованістю	Висока інформованість

Табл. 16. Основні групи потенційних споживачів і їх потреби

<b>Категорія (група) клієнтів</b>	<b>Потреби, які він задовольняє за допомогою Вашого продукту</b>
Еко-активісти	Еко-обізнаність, пропагування власної позиції
Середній клас +	Можливість впливати на покращення навколишнього середовища
Покоління «ЗЕТ»	Відповідність трендам в епоху ІТ-технологій

Табл. 17. Паспорт потенційного клієнта .

Характеристика	значення
Організаційно-правова форма	Товариство з обмеженою відповідальністю (ТОВ)
Класифікація -за потужністю -за чисельністю персоналу -за обсягом виробництва -за сезонністю виробництва -інше	Мале підприємство; До 50 осіб персоналу; Несезонне виробництво
Розташування -місто -сміт -село -інше	Периферія міста; Село (Приклад: ТОВ «Фурси Енерджі Груп (сонячна електростанція) – місцезнаходження село Фурси, Київська область)
Вид продукту, який потрібен даному споживачеві	Біодизель (рідке паливо)
Призначення придбаної розробки -за призначенням -інше	Для заправки автомобілів
Кваліфікація персоналу підприємства -робочі -службовці -керівники	Топ-менеджмент (до 5 осіб) Інженери (до 15 осіб) Мікробіологи, Біотехнологи (до 15 осіб) Бухгалтерія та адміністрування (до 5 осіб) Молодший персонал (до 10 осіб)

Потенційний обсяг споживання розробки -одиниця -1-5 -інше	5-15 літрів для заправки машини До 100 000 літрів (для АЗС)
Хто приймає рішення про придбання розробки	За протоколом загальних зборів про значні правочини

Табл. 18. Запланований обсяг реалізації стартап-продукту (тис.літрів).

	Січень 2020	Лютий 2020	Березень 2020	Квітень 2020	Травень 2020	Червень 2020	Липень 2020	Серпень 2020	Вересень 2020	Жовтень 2020	Листопад 2020	Грудень 2020
Запланований обсяг	12	12	12	12	15	15	15	15	15	15	15	15

Табл. 19. Проектні ціни продажу ідеї, технології, методики, програми.

Найменування товару	Планові обсяги продажу		Аналоги, прототипи	
	Кількість, д.	Ціна, грн/л.	Кількість, од.	Ціна, грн/л.
Біодизель з мікроводоростей	100 000	58	-	140

### Розрахунок ціни інноваційної пропозиції

#### 1. Витратний метод.

$$Ц = С + \%П = 50 + 3\% = 50 + 1,5 = 51 \text{ грн } 50 \text{ коп.}$$

Де  $C$  – ціна одиниці товару, грн.,  $S$  – собівартість одиниці, грн.,  $\%P$  – відсоток прибутку,  $\%P = 1-3\%$ .

2. Агрегатний метод.

$$C = C_1 + C_2 + \dots + C_n = 34 + 12 + 5 + 3 + 4 = 58 \text{ грн.}$$

Де  $C$  – ціна одиниці товару, грн.,  $C_{1...n}$  – ціни складових частин, грн.

3. Параметричний метод.

$$C_n = \frac{B_n}{B_b} \cdot C_b = \frac{2}{3} \cdot 140 = 93 \text{ грн.}$$

Де  $C_n$  – ціна нового продукту, грн.,  $C_b$  – ціна базового продукту (була взята вартість продукції Algaediesel, Туреччина), грн.,  $B_b$  – бали за властивості базового продукту,  $B_n$  – бали за властивості нового продукту (вирішальними і принципово новими були: отримання раціональної кількості біомаси та вмісту ліпідів в клітинах водоростей).

4. Метод точки беззбитковості.

$$C = C = 50 \text{ грн.}$$

Де  $C$  – ціна одиниці товару, грн.,  $S$  – собівартість одиниці, грн.

5. Метод конкурентних цін.

$$C = \frac{C_{x1} + C_{x2} + C_{x3}}{N} = \frac{140}{1} = 140 \text{ грн.}$$

Де  $C$  – ціна одиниці товару, грн.,  $C_{x1, x2, x3}$  – ціни конкурентів, грн.,  $N$  – кількість використаних цін конкурентів.

Для ціноутворення був обраний агрегатний метод, адже на перших етапах виробництва біодизелю можливі постійні зміни складових для його отримання (постійний пошук нового/більш дешевого обладнання для використання, зміна концентрацій певних реагентів для середовища через контроль приросту біомаси).

#### 4.5. Ціна інноваційної пропозиції на ринку.

Табл. 20. Калькуляція собівартості стартап-продукту.

№	Елемент собівартості	Кількісний показник	Вартісний показник
1.	Затрати на сировину і матеріали	1	1 500 000 грн
2.	Заробітна плата і нарахування (ЄСВ)	1	До 100 000 грн

Табл. 21. Забезпеченість проекту основними засобами .

Місце ОЗ у технологічному процесі	Назва ОЗ	Повна початкова вартість ОЗ	Плановий період експлуатації ОЗ	Очікуваний п'остачальник	Джерело фінансування придбання
Пасивна частина виробництва	Споруда, де знаходиться виробництво	0 (на базі наукового закладу або готового виробництва)	На першому етапі - 1 рік	науковий заклад або готове виробництво	-
Основне обладнання (у виробничому процесі)	Реактор та інше обладнання	0 (готове обладнання виробництва)	На першому етапі - 1 рік	науковий заклад або готове виробництво	-

Табл. 22. Забезпеченість проекту оборотними фондами.

Група ОбФ	Назва	Норма витрат на півроку	Ціна, грн/од	Очікуваний постачальник	Джерело фінансування
Сировина і матеріали	Сировина	100 000	200	ТОВ «Ковалент»	Власні кошти

	Матеріали	500 000	50 000	ТОВ «Стеллар»	Інвестиції
--	-----------	---------	--------	------------------	------------

Табл. 23. Забезпеченість проекту трудовими ресурсами.

Категорія кадрів	Назва посади	Чисельність	Кв. вимоги	Плановий рівень заробітної плати	Джерело фінансування ФОП
Дослідники	Біотехнолог	До 20	Запуск та контроль культивування  Отримання цільового продукту	10 000 грн	Власні кошти
Інженери	Інженер	До 20	Контроль та ремонт обладнання	10 000 грн	Інвестиції
Бухгалтерія Та адміністрація	Біллінг-менеджер/бухгалтер	До 5	Створення пеконічної стабільності, рахунків, договорів та актів виконаних робіт	10 000 грн	Інвестиції
Топ менеджмент	Партер/Директор	До 2	Пошук нових інвестицій, комунікація з клієнтами	15 000 грн	Власні кошти

Табл. 24. Техніко-економічні показники проекту.

Показники	Одиниця виміру	Результат
Піврічний обсяг реалізації ідеї, технології, методики	Од.	50 000
Середньорічна чисельність персоналу	Осіб	50
Середньорічний виробіток робітника	Од./особу	10 000
Капіталовкладення	Грн.	1 500 000
Повна собівартість	Грн./од	15
Відносний прибуток	Грн./од	40



Рентабельність	%	120
Період повернення капіталовкладень	Місяців	48
Фондовіддача	Грн.	10 000
Фондоємкість	Грн.	0,00001
Продуктивність праці	Грн/особу	10 000
Коефіцієнт економічної ефективності		0,333

#### 4.6. Концепцію бізнес-моделі проекту та карта бізнес-процесів реалізації проекту.

Табл. 25. Карта бізнес-процесів проекту.

Стадія реалізації стартап проекту	Бізнес-процеси	Характеристики		
		Задіяні ресурси	Орієнтовна тривалість процесу	Верхня межа фінансових витрат
Розробка ідеї стартапу	Генерація ідеї	Розробник	5 років	0 – 10 000 грн
	Літогляд, пошук патентів	Розробник	3 роки	0 – 15 000 грн
Реалізація ідеї	Проведення досліджень	Розробник, лабораторія	10 років	20 000-1 000 000 грн
	Розробка логотипу, назви	Розробник, комп'ютер	3 місяці	3 000 грн
	Культивування	Розробник	1 місяць	10 000 грн
	Закупівля необхідних складових реакторів	Розробник, транспорт	3 тижні	500 000 грн
	Отримання цільового продукту	Послуги програміста	13 днів	5 000 грн
Впровадження у виробництво	Реклама в медіа	Соц. мережі	2 тижні год.	10 000 грн
	Робота з інвесторами/інтеграція	Розробник, споживачі	1-3 місяці	0 грн
	Пакувальні матеріали	Розробник	1 рік	10 000 грн

Масова реалізація	Транспортування у мережі продажу на АЗС	Робота водія та вантажників	1-2 тижні	20 000 грн
	Продаж через інтеграцію	Невідомо/унікально	невідомо	0 грн

Табл. 26. Системний аналіз бізнес-процесів стартапу.

Функції	Елементи
	Розробник
Генерація ідеї	+
Літогляд, пошук патентів	+
Проведення досліджень	на стадії роботи
Розробка логотипу, назви	-
Закупівля необхідних складових	-
Виробництво	-

#### 4.7. Ризики розробки та методи управління ними.

Табл. 27. Ризики інноваційної розробки.

Назва процесу	Бізнес-процеси	Зовнішні ризики	Внутрішні ризики
Розробка ідеї стартапу	Генерація ідеї	Неможливість продати продукт	Втрата грошей
Реалізація ідеї	Проведення досліджень	Негативні результати Дороговизна	Втрата інвестицій Зупинка проєкту

	Розробка логотипу, назви	Незацікавленність споживачів	Втрата грошей Втрата інвестицій Зупинка проєкту
	Культивування	Збій в параметрах та обладнанні	Втрата грошей
	Розробка сайту	Незацікавленність споживачів	Втрата грошей
Впровадження у виробництво	Інтеграція Продаж на АЗС	Незацікавленність споживачів Незацікавленість підприємств	Втрата грошей Втрата інвестицій Зупинка проєкту

Табл. 28. Оцінка ризиків та план заходів з управління ризиками.

Бізнес-процес і його ризики		Ймовірність настання ризику	Вплив ризику на дохід	Заходи страхування
Розробка ідеї стартапу	Генерація ідеї	10%	60%	Створення експертного висновку та теоретичних первинних результатів
Реалізація ідеї	Проведення досліджень	90%	100%	Модернізована лабораторія, більше спеціалістів та попередніх досліджень

	Розробка логотипу, назви	5%	25%	Аналіз на цільовій аудиторії
	Культивування	5%	80%	Пошук постачальників, літогляд
	Розробка сайту	10%	30%	Пошук надійних програмістів
Впровадження у виробництво	Інтеграція	40%	50%	Пошук нових платформ
	Продаж на АЗС	50%	50%	Посилення пропаганди, освітницької діяльності

Табл. 29. Методи управління ризиками.

Методи управління ризиками	Методи, які можна використати
Ухилення від ризику	- Відмова в інтеграції з виробництвами з заборгованістю та тих що на загрозі банкрутства
Прийняття ризику	- Самострахування
Попередження (скорочення) ризику	- Лімітування (створення невеликих обсягів готової продукції на перших етапах); - Стратегічне планування діяльності; - Активний цілеспрямований маркетинг та пропогування екологічного палива у ЗМІ;
Передача ризику	- Інтеграція з готовим виробництвом - Іноземні інвестиції - Аутсорсинг (якщо повністю зануритись у розробку технологічних процесів, процеси бізнес моделювання можна передати консалтинговим та фінансовим компаніям)

## РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ОХОРОНА ДІВКІЛЛЯ

Підвищення технічної оснащеності сучасних підприємств, застосування нових матеріалів, конструкцій і процесів, підвищення швидкостей і потужностей машин впливають на характер і частоту нещасних випадків і захворювань на виробництві.

Автоматизація виробництва зменшила затрати праці на одиницю продукції, однак з'явився ряд проблем, пов'язаних з підвищенням нервовопсихічного навантаження на операторів, тощо. Закон «Про охорону праці» зобов'язує роботодавця створити задовільні умови на кожному робочому місці відповідно до нормативно-правових актів, а також забезпечити додержання вимог законодавства щодо прав працівників у галузі охорони праці [57].

Сьогодні, охорона праці й поліпшення умов праці є одним з найважливіших завдань. Безпечне ведення технологічного процесу знижує можливість травматизму, підвищує працездатність обслуговуючого персоналу. Установки повинні мати конструкцію, компоновку устаткування і трубопроводів, які забезпечують умови роботи обслуговуючого персоналу відповідно до діючих норм техніки безпеки і ергономіки. На персонал впливають такі фактори як: можливість ураження електричним струмом, шум, вміст газових домішок у повітрі, які можуть привести до вибуху та отруєння, біологічне ураження продуцентом. Основні фактори:

- 1) виробничий шум і вібрації;
- 2) повітря робочої зони;
- 3) електронебезпека;
- 4) пожежна та вибухонебезпека;

Найбільш часті причини аварій посудин, що працюють під тиском, це невідповідність конструкції максимально допустимому тиску і температурі;

втрата механічної міцності апарата (корозія, внутрішні дефекти металу, місцеві перегріву); невиконання встановленого режиму роботи; недостатня кваліфікація обслуговуючого персоналу; відсутність належного технічного нагляду.

Вимоги безпеки, що пред'являються до конструкції, виготовлення, та експлуатації посудин, що працюють під тиском, визначені «Правилами будови і безпечної експлуатації посудин, що працюють під тиском».

*Рівень шуму та вібрацій.* Приміщення, в якому розміщена лінія являє собою закритий тип. Основними джерелами шуму при роботі вважаються електродвигуни, компресори та інше устаткування в яких шум може досягнути значення 90 дБА. Згідно норм ДСН 3.3.6.037-99 шум, при роботі, не повинен перевищувати значення в 80 дБА [58]. Заходи і матеріали, які застосовуються для пониження рівня шуму механічного походження включають:

- використання облицювального шумоізоляційного матеріалу з перфоруванням;
- звукоізоляція устаткування за допомогою глушників, резонаторів, кожухів, захисних конструкцій, тощо;
- звукоізоляція дверного проїому приміщення, покриття стін та підлоги;
- своєчасне змащування всіх поверхонь, що труться;
- застосування раціональних конструкцій, нових матеріалів і технологічних процесів.

Дані заходи дозволяють знизити рівень шуму до прийняттого згідно з ДСН 3.3.6.037-99.

*Повітря робочої зони.* Вентиляційна система має забезпечити виведення пилу (до 18 мкм) з приміщення і доведення якості повітря до встановлених

норм. Для індивідуального захисту працівників від летючих подразників застосовують респіратори, протигази, захисні костюми. Аеродинамічні випробування вентиляційних систем проводять не рідше одного разу на рік, а також після кожного капітального ремонту або реконструкції.

Якщо вентиляційна система не забезпечує нормальних умов і чистоти повітря у приміщеннях, то застосовують систему кондиціонування повітря. Необхідно забезпечити захист працівників від елементів устаткування, нагрітих до високих температур і теплового випромінювання яке не повинно перевищувати  $q = 350 \text{ Вт/м}^2$ . Апарати повинні мати теплоізоляцію з мінеральної вати товщиною від 10 см, що забезпечить прийнятну температуру на поверхні барабана і теплове випромінювання відповідно до ДСН 3.3.6.042-99. Перед запуском технологічних апаратів необхідно провести промивку і продувку всіх комунікацій і устаткування, перевірити їх герметичність. Всі насоси, завантажувальні пристрої та інші механізми і машини перевіряють без навантаження і під навантаженням на інертних середовищах. Приміщення обладнанні стендами з зазначеними правилами техніки безпеки, правилами з експлуатації установки, стендами з планом еваковиходів. Перед початком робіт працівники повинні проходити інструктаж з техніки безпеки.

*Електробезпека.* Приміщення операторної згідно ПУЕ-2017 відноситься до приміщень із підвищеною небезпекою, тому що можливий одночасний дотик людини до з'єднаних під землею технологічних апаратів і металевих корпусів електроустаткування.

Основні причини нещасного випадку від впливу електричного струму наступні:

- випадковий дотик або наближення на небезпечну відстань до струмопровідних частин, що перебувають під напругою;
- поява напруги на конструктивних металевих частинах електроустаткування - корпусах, кожухах

- у результаті ушкодження ізоляції й інших причин;
- виникнення крокової напруги на поверхні землі в результаті замикання дроту на землю.

Щоб уникнути нещасних випадків застосовується захисне занулення із глухозаземленою нейтраллю. Щоб уникнути ураження від статичної електрики, тому що приміщення категорійне, робиться сітка з металевих пластин перетином  $25 \times 4$  мм, що розташовується по периметру приміщення, і до якої приєднують мідним дротом  $S = 10 \text{ мм}^2$  металеві частини апаратів й устаткування, які перебувають у цьому приміщенні. Для забезпечення безпечної роботи з електроустаткуванням – кабелі та дроти вкладені в труби й захищені під підлогу, рубильники ввімкнення закриті в спеціальні шафи, при роботі з електроінструментами застосовуються індивідуальні засоби захисту.

У зв'язку з вищевикладеним пропонується дотримуватися наступних правил техніки безпеки й проводити наступний комплекс заходів щодо забезпечення електробезпечності на проєктованій ділянці:

1. Для запобігання небезпеки ураження електричним струмом, устаткування повинне мати надійний металевий зв'язок корпусів електродвигунів, щитів, постів електроапаратури і сталевих труб електропроводки із заземлювальним контуром.

2. При експлуатації електроустаткування необхідно дотримуватися наступних правил безпечної роботи:

- забороняється доторкатися до електропроводів, робити ремонт електроустаткування, знімати й установлювати електролампи, запобіжники й інші деталі електроустаткування особам, які не мають права допуску;

- входити в розподільну щитову, відкривати електрозбірки, входити в місця, де висять таблички «Вхід заборонений», «Небезпечно для життя» й інші попереджувальні написи. Вхід дозволяється чітко обмеженому колу людей з дотриманням правил про допуск;



- для переносного освітлення користуватися лампами напругою не більше 12 В;

- перед проведенням ремонтних робіт на встаткуванні лінії електродвигуни повинні бути зупинені, знеструмлені й від'єднані від приводів, на пускових кнопках повинні бути вивішені плакати «Не вмикати, працюють люди». Відключення електроенергії проводиться електриком;

- відповідальний електрик за електрогосподарство лінії систематично перевіряє відповідність заземлення устаткування правилам технічної експлуатації, особливо після його ремонту;

- установлення плакатів і знаків безпеки. Пожежна безпека. На лінії виробництва біодизеля горючими речовинами є: біодизель, етиловий спирт та мастило, яким змазуються частини конструкції. Пожежні характеристики небезпечних речовин, матеріалів:

Мастило: Температура займання 300°C; температура самозаймання 370°C.

Біодизель: Температура займання 285°C; температура самозаймання 320°C.

*Етиловий спирт:* Температура займання 13°C; температура самозаймання 404°C. Біодизель є вибухонебезпечним матеріалом, відноситься до горючих матеріалів, тому технологічний процес утилізації біодизеля відноситься до категорії В (ДСТУ Б В.1.1-36:2016).

Згідно ПУЕ клас зони установки ПШа (зони, розташовані в приміщеннях, в яких зберігаються горючі речовини). Цех в якому знаходиться установка виробництва біодизеля будується з використанням негорючих матеріалів (бетона, залізобетона), тому стійкість споруди за ДБН В.1.1-7-2002 відповідає ступеню вогнестійкості II.

В разі виникнення пожежі встановлені датчики-сповіщувачі, які спрацьовують при підвищенні температури до 89°C. Для гасіння невеликих ділянок загорання при виключеному та включеному (до 1000В) електроустаткуванні застосовують вуглекислотні вогнегасники ОУ-5 (2 шт.) та порошкові ОП-10 (2 шт.). Як стаціонарні засоби пожежогасіння встановлені самоспрацьовуючі вогнегасники САМ-9 (25 шт.).

У приміщенні, де розташовується установка, на відстані 30 метрів одне від одного встановлені пожежні гідранти з рукавами довжиною до 10 метрів. Відстань до пожежного виходу не більше 40 метрів. Відповідно до ДБН В.1.1-7-2002 кількість виходів - не менше двох. Ширина дверей евакуаційного виходу - 2 метри. Двері евакуаційного виходу відкриваються на зовні [62]. Охорона навколишнього середовища. Заміна агресивних і канцерогенних екстракторів ліпідів з біомаси, таких як формальдегід в суміші з метанолом, на систему надкритичної екстракції значно зменшує антропогенне навантаження на навколишнє середовище і попереджає можливий викид забруднюючих речовин.

До того ж, CO<sub>2</sub> у системі можна використовувати повторно за наявності обладнання з очистки та зрідження газу. Застосування біодизеля в традиційних дизельних двигунах значно знижує викиди в атмосферу вуглеводнів, оксиду вуглецю, сульфатів, ароматичних вуглеводнів і твердих частинок в порівнянні з нафтопродуктами. Крім того, і це особливо важливо, використання біодизеля скорочує кількість викидів в атмосферу токсичних і канцерогенних речовин. Використання чистого біодизеля (100%) може знизити ризик ракових захворювань на 94%.

Суміш, що складається з 80% звичайного дизеля і 20% біодизеля (В 20), зменшує ризик ракових захворювань на 26%. Завдяки тому, що біодизель не містить сірки, при його спалюванні в атмосферу не надходить SO<sub>2</sub>. А високий вміст в біодизелі кисню сприяє більш повному спалюванню CO<sub>2</sub>. Крім того, у викидах скорочується вміст вуглецю в формі твердих частинок. У порівнянні

з "викопним" дизелем, при спалюванні чистого біодизеля обсяги викидів в атмосферу діоксиду вуглецю зменшуються більш ніж на 75%, а при спалюванні 20% біодизеля - на 15%.

## ВИСНОВКИ

1. Було проведено літературний огляд стосовно впливу подачі вуглекислого газу та інших факторів на ріст та розвиток мікроводоростей *Chlorella vulgaris*. Наведено характеристику *Chlorella vulgaris*, місце в систематиці. Проаналізовано вплив елементів середовища на життєдіяльність, приріст біомаси та накопичення запасних речовин, а також вивчено вплив параметрів культивування на *Chlorella vulgaris*.

2. Було визначено методи та матеріали, необхідні для проведення дослідження. Було обрано ерліфтний біореактор для проведення серії дослідів щодо визначення найбільшого приросту біомаси, та обрано наступні діаметри отворів дифузора: 0,5 мм, 0,7 мм, 1 мм, 1,5 мм та контроль - 5 мм. Розрахована розчинність CO<sub>2</sub> у середовищі становить 1,75\*10<sup>-3</sup> г/л, 0,972\*10<sup>-3</sup> г/л, 0,08\*10<sup>-3</sup> г/л, 0,432\*10<sup>-3</sup> г/л, 0,14\*10<sup>-3</sup> г/л відповідно. Розраховані показники розчинності вказують на те, що зі зменшенням діаметру дифузора, збільшується розчинність вуглекислого газу у середовищі. Для культивування було обране Селективне середовище Громова №6, що у поєднанні з особливостями будови реактора зменшує ризики контамінації культуральної рідини. Для аналізу культуральної рідини та приросту біомаси обрано спектрофотометричний метод, рН-метрію та мікроскопію. Час подачі чистого вуглекислого газу встановлено 2 хв на добу з метою зменшення ризику сильного підкислення середовища зі швидкостями подчачі 0,6 та 0,3 дм<sup>3</sup>/хв для різних серій дослідів.

3. Було проведено серію дослідів з культивування *Chlorella vulgaris*. За вимірами кислотності середовища, було встановлено, що подача чистого CO<sub>2</sub> протягом 2 хвилин на добу призводило до закислення середовища, причому реактори з найменшим діаметром отворів (0,5 мм та 0,7 мм) характеризувалися найбільшим спадом рівню рН протягом всього дослідження. Встановлений час барботування чистим вуглекислим газом (2 хв/добу) виявився раціональним для діаметру дифузора 0,7 мм бо відбувається достатнє розчинення газу у середовищі для засвоєння карбону

мікроводоростями, при цьому не створюючи закислення середовища, що відбулось при використанні діаметру в 0,5 мм. рН середовища для контролю на останній день культивування становило 4,99 (зниження на 5% порівняно з першим днем культивування); для діаметру 0,5 мм – 4,5 (зниження на 12% порівняно з першим днем культивування); 0,7 мм - 4,95 (зниження на 5,2 % порівняно з першим днем культивування); 1 мм – 5,1 (зниження на 3 % порівняно з першим днем культивування) та 1,5 мм – 5,07 (зниження на 2% порівняно з першим днем культивування). Підвищення кислотності середовища для контролю є меншою лише на 0,2% порівняно з діаметром 0,7 мм, проте характеризується нижчою розчинністю CO<sub>2</sub> та меншими значеннями приросту біомаси. Реактор з діаметром 0,5 мм показав максимальні значення оптичної густини – 0,58 порівняно з діаметром 0,7 мм та 1 мм (максимальні значення оптичної густини 0,64 та 0,614 відповідно), що свідчить про те, що відбулось різке закислення середовища. При використанні діаметру 1,5 мм максимальне значення оптичної густини складає 0,5, що рівне максимальному значенню оптичної густини для контролю – це свідчить про погану розчинність вуглекислого газу у середовищі, не зважаючи на більше закислення середовища для контролю порівняно з діаметром 1,5 мм.

Контроль (5мм) характеризується наступними показниками питомої швидкості росту - при швидкості подачі газу 0,6 дм<sup>3</sup>/хв – 0,016 діб<sup>-1</sup>, при 0,3 дм<sup>3</sup>/хв – 0,056 діб<sup>-1</sup>. Діаметр 1,5 мм характеризується найнижчими показниками: 0,6 дм<sup>3</sup>/хв – 0,013 діб<sup>-1</sup> та 0,3 дм<sup>3</sup>/хв - 0,049 діб<sup>-1</sup>, що менше за контроль на 8,3% та 2,5% відповідно.

Визначено, що питома швидкість росту мікроводоростей протягом лаг-фази в фотобіореакторах з діаметрами дифузора 0,7 мм та 1 мм має найбільше середнє значення серед всієї серії дослідів у порівнянні з іншими і досягає – 0,017 діб<sup>-1</sup> станом на 31 добу культивування при швидкості подачу газу 0,6 дм<sup>3</sup>/хв та 0,082 діб<sup>-1</sup> та 0,086 діб<sup>-1</sup> відповідно станом на 14 добу культивування при швидкості подачі CO<sub>2</sub> 0,3 дм<sup>3</sup>/хв. Реактор з

діаметром 1 мм характеризується найвищим показником серед інших реакторів при швидкості подачі газу  $0,3 \text{ дм}^3/\text{хв}$  на 14 добу культивування –  $0,086 \text{ діб}^{-1}$ , проте за умов подачі газу зі швидкістю  $0,6 \text{ дм}^3/\text{хв}$  характеризується одним з найменших показників питомої швидкості росту –  $0,015 \text{ діб}^{-1}$ , що вказує на черезмірну розчинність вуглекислого газу в середовищі за вищої швидкості подачі газу, що впливає на рівень рН. За швидкості подачі газу  $0,3 \text{ дм}^3/\text{хв}$  діаметр  $0,7 \text{ мм}$  показав трохи менший показник –  $0,082 \text{ діб}^{-1}$ , що менший лише на 5% за найвищий показник у діаметру 1 мм, проте з вищим на 40% за контроль. Це свідчить про те, що реактор з діаметром  $0,7 \text{ мм}$  показав високі показники питомої швидкості росту за різних швидкостей подачі  $\text{CO}_2$ .

Було розраховано кількість клітин у кожному з дослідів, співвідношення живих/мертвих клітин в трипановим синьому. Для Контролю -  $6,69 \cdot 10^5$  кліт./мл, з низькими значеннями мертвих клітин – 6%. Найнижчі значення по кількості клітин отримали в реакторі з діаметром дифузора  $1,5 \text{ мм}$  –  $9,38 \cdot 10^4$  кліт./мл; для  $1 \text{ мм}$  -  $5,28 \cdot 10^5$  кліт./мл. з 1% мертвих клітин, що більше у 5 разів порівняно з діаметром  $1,5 \text{ мм}$  та на 12% більше за контроль).

Встановлено, що використання діаметру отворів дифузора  $0,7 \text{ мм}$  характеризується найвищою кількістю живих клітин –  $8,62 \cdot 10^5$  кліт./мл, що на 30% більше за контроль та 18% більше за діаметр  $1,5 \text{ мм}$  (мертві клітини при цьому не спостерігали). Дифузор з діаметром  $0,5 \text{ мм}$  характеризується найбільшою кількістю мертвих клітин (17%), що вказує на те, що досить високі показники оптичної густини не є раціональними через наявність великої кількості мертвих клітин порівняно з контролем (6%).

Отже, за одержаними даними, при використанні діаметру дифузору  $0,7 \text{ мм}$  для культивування *Chlorella vulgaris* в ерліфтному біореакторі було одержано такі показники: максимальне значення оптичної густини –  $0,64$ , питома швидкість росту -  $0,017 \text{ діб}^{-1}$  при культивуванні в 31 добу при швидкості подачу газу  $0,6 \text{ дм}^3/\text{хв}$  та  $0,082 \text{ діб}^{-1}$  при культивуванні 14 діб при

швидкості подачу газу  $0,3 \text{ дм}^3/\text{хв}$ . Даний дифузор характеризується високою розчинністю газу -  $0,972 \cdot 10^{-3}$ , г/л<sub>роз</sub>.

4. Згідно з розробкою стартап-проекту, даний проект можна вважати проміжним етапом між розробкою та впровадженням, адже цінність роботи визначається детальним дослідженням одного з параметрів культивування мікроводоростей. Даний параметр є одним з факторів впливу на отримання продукту-сировини, що містить у собі певні характеристики саме цільового продукту – ліпідів. Так як  $\text{CO}_2$  не є параметром, що впливає на отримання більшої кількості ліпідів у *Chlorella vulgaris* після культивування, робота не може напряду нести у собі цінність в розробці цільового продукту, проте має вплив саме на розвиток сировини (мікроводоростей) та її кількості (біомаси). Саме тому цінність формується у вигляді «розробки оптимального параметру для подальшого впровадження».
5. Було запропоновано пропозиції та заходи щодо забезпечення охорони праці, техніки безпеки, охорони довкілля, згідно до ДСТУ та ДБН.

## ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Дячок В.В., Левко О.Б. Вивчення процесу масообміну при перетворенні вуглекислого газу у метан біологічним методом. Екологічна безпека. 2014. №1(17). С.31-35.
2. Olumide Wesley Awe, Yaqian Zhao, Ange Nzihou, Doan Pham Minh, Nathalie Lyczko. A Review of Biogas Utilisation, Purification and Upgrading Technologies. *Waste Biomass Valor.* 2017. p.1-18.
3. Мамедова Ф.Т. Различные подходы к накоплению биомассы микроводорослей *Chlorella vulgaris* и к процессам ее биокаталитической трансформации : дис. ... канд. хим. наук : 03.01.06. Москва, 2015. С.176.
4. Roudsari F.P., Mehrnia M.R., Asadi A., Moayedi Z., Ranjbar R. Effect of microalgae activated sludge ratio on cooperative treatment of anaerobic effluent of municipal wastewater. *Appl Biochem Biotechnol.* 2014. V.172. p.131 – 14.
5. Моисеев И., Тарасов В., Трусов Л. Эволюция биоэнергетики. Время водорослей. *The Chemical Journal.* 2009. № 12. С. 24–29.
6. Pulz O., Gross W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Microbiol. Biotechnol.* 2004. V. 65. p. 635–648.
7. Аужанова Н.Б. Морфологическая и систематическая характеристика хлореллы. Ее производство и применение. *Научный вестник.* 2014. №1. С.113-126.
8. Дворецкий Д. С., Дворецкий С. И., Темнов М. С. Технология получения липидов из микроводорослей : монография. Тамбов : ФГБОУ ВПО «ТГТУ», 2015. 100 с.
9. Богданов Н.И. Суспензия хлореллы в рационе сельскохозяйственных животных. : монография. Пенза : ВНИИОЗ, 2007. 48 с.



9. Carl Safi, Bachar Zebib, Othmane Merah, Pierre-Yves Pontalier, Carlos VacaGarcia. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*. *Renewable and Sustainable Energy*. 2014. № 35. С. 265–278.
10. Рубин А.Б. Биофизика фотосинтеза и методы экологического мониторинга. *Технология живых систем*. 2005. Т. 2. С. 47-68.
11. ООО "Европолитест": тест-объекты - Хлорелла (*Chlorella vulgaris*). URL: [http://europolytest.com/information/testobjekts/testobjekts-1\\_18.html](http://europolytest.com/information/testobjekts/testobjekts-1_18.html) (дата звернения: 19.04.2019)
12. Чернова, Н. И. Эффективность производства биодизеля из микроводорослей. *Энергосбережение, новые и возобновляемые источники энергии*. 2014. С. 14 – 21.
13. Янкевич М. И. Формирование ремедиационных биоценозов для снижения антропогенной нагрузки на водные и почвенные экосистемы: автореферат : дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.20. Щелково, 2002. – 50 с.
14. Моисеев И., Тарасов В., Трусов Л. Эволюция в биоэнергетике. *Время водоросле. Альтернативная энергетика*. 2009. № 12. С. 24–29.
15. Макарова Е. И., Отурина И. П., Сидякин А. И. Прикладные аспекты применения микроводорослей – обитателей водных экосистем. *Экосистемы, их оптимизация и охрана*. 2009. Вып. 20. С. 120–133.
16. Gigova L., Marinova G. Significance of microalgae - grounds and areas. *Genetics & Plant Physiology*. 2016. Vol. 6(1–2). С.26-31.
17. Latala A. Effects of salinity, temperature and light on the growth and morphology of green planktonic algae. *OCEANOLOGIA*. 1991. № 31. С.119-138.
18. Минюк Г. С. Одноклеточные водоросли как возобновляемый биологический ресурс. *Морской экологический журнал*. 2008. –Т. 7, № 2. С. 5–23.

19. Астахова, В. І. Культивування мікроводоростей з подальшим одержанням біодизельного палива : дипломний проект ... бакалавра : 6.051401 Біотехнологія / Астахової Владислави Ігорівни. – Київ, 2019. – 106 с.
20. Spolaore, P. Commercial applications of microalgae. *Biosci. Bio eng.* 2006. V. 101, N. 2. P. 87—96.
21. Ефремова Н. Е. Разработка способов получения антиоксидантных препаратов на основе биоактивных веществ цианобактерий и микроводорослей : автореферат : дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.20. Кишинев, 2009. 29 с.
22. Швец, В. И. Фосфолипиды в биотехнологиях. *Вестник МИТХТ.* 2009. С. 4 – 25.
23. Золотарьова О. К. Перспективи використання мікроводоростей у біотехнології : монографія. К. : Альтерпрес, 2008. 235 с.
24. Mann G., Schlegel M., Schumann R., Sakalauskas A. Biogas-conditioning with microalgae. *Agronomy Research.* 2009. 7(1). С. 33-38.
25. Bailón Allegue, L., Hinge, J. Biogas upgrading Evaluation of methods for H<sub>2</sub>S removal. Danish Technological Centre. Copenhagen, 2014. С.1-31.
26. Takashi Furihata, Supreeya Pomprasirt. Characteristics of Sulfite Transport by *Chlorella vulgaris*. *Plant Cell Physiol.* 1997. 38(4). P.398-403.
27. Kuster E., Dorusch F., Altenburger R. Effects of hydrogen sulfide to *Vibrio fischeri*, *Scenedesmus vacuolatus*, and *Daphnia Magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 2005. 24(10). 2621–2629.
28. Golub N.B., Voyevoda D.V. Effect of Sulphur compounds on cultivation process of microalgae *Chlorella vulgaris*. *Вісник Національного університету "Львівська політехніка". Хімія, технологія речовин та їх застосування.* 2013. № 761. С.151-158.

29. Голуб Н.Б., Бунча В.Ю. Вплив іонів лужних металів на приріст біомаси та накопичення ліпідів (метаболізм) у *Chlorella vulgaris*. Наукові вісті НТУУ “КПІ”. 2012. №3. С. 12–17.

30. Daliry S., Hallajisani A., Mohammadi Roshandeh J. Investigation of optimal condition for *Chlorella vulgaris* microalgae growth. *Global J. Environ. Sci. Manage.* 2017. №3(2). С. 217-230.

31. Mostafa M. El-Sheekh. The effect of different growth conditions on the biomass and chemical constituents of *Chlorella vulgaris*. *Egypt. J. Exp. Biol.* 2018. № 14(1). С. 121 – 131.

32. David J. Spedding, Irmrgarg Ziegler. Effect of pH on the Uptake of <sup>35</sup>S-sulfur from Sulfate, Sulfite, and Sulfide by *Chlorella vulgaris*. *Pflanzenphysiol.* 1980. Bd. 97. P. 205-214.

33. Jamal E., Luturmas A. Some eco-physiological responses of *Chlorella vulgaris* culture in different environmental conditions. *AAAL Bioflux. Volume 9, Issue 5.* С. 1030-1035

34. Паршикова Т.В., Третьяков В.О., Пацко О.В. Застосування мікроелементів для оптимізації мінерального живлення за промислового культивування мікроскопічних водоростей. *Физиология и биохимия культурных растений.* 2010. Т.42 №5. С. 403-413.

35. Упитис В.В. Макро- и микроэлементы в оптимизации минерального питания микроводорослей: монография. Рига: Зинатне, 1983. 240 с.

36. González-Sánchez A., Posten C. Fate of H<sub>2</sub>S during the cultivation of *Chlorella* sp. deployed for biogas upgrading. *Journal of Environmental Management.* 2017. №191. P.252-257.

37. Krausst F., Schmid A. Sulphur Sources for Growth of *Chlorella fusca* and Their Influence on Key Enzymes of Sulphur Metabolism. *Journal of General Microbiology*. 1987. № 133. С.1209-1219.

38. Giordano M., Norici A., Hell R. Sulfur and phytoplankton: acquisition, metabolism and impact on the environment. *New phytologist*. №166 С.371–382.

39. Dorman DC, Moulin FJM, McManus BE, Mahle KC, James RA, Struve MF. Cytochrome oxidase inhibition by acute hydrogen sulfide inhalation: Correlation with tissue sulfide concentrations in the rat brain, liver, lung, and nasal epithelium. *Toxicol Sci*. 2002. V. 65. P.18–25.

40. Jerry D Murphy, Bernhard Drog, Eoin Allen. A perspective on algal biogas. *IEA Bioenergy*. 2015. 40 с.

41. SolverBook: свойства и все характеристики сероводорода. URL: <http://ru.solverbook.com/spravochnik/ximiya/soedineniya/serovodorod/> (дата звернення: 24.04.2019)

42. Alondra A. Cortés, Sebastián Sánchez-Fortún. Effects of pH on the growth rate exhibited of the wild-type and Cd-resistant *Dictyosphaerium chlorelloides* strains. *Limnetica*. 2018. № 37(2). С. 229-238.

43. Золоторева Е.К., Шнюкова Е.И., Подорванов В.В. Микроводоросли как продуценты водорода. *Альгология*. 2010. Т. 20. №2. С. 224-249.

44. Антал Т. К. Механизмы адаптации фотосинтетического аппарата к недостатку основных элементов минерального питания : дис. ... д-ра биол. наук : 03.01.02. Москва, 2018. – 252 с.

45. Adoracion P. Resurreccion , Amane Makino. Effects of sulfur nutrition on the growth and photosynthesis of rice. *Soil Science and Plant Nutrition*. 2001. V.47(3). P.611-620,

46. Ling Yang Feng, Nasir Iqbal. Effect of Sulphur Application on Photosynthesis and Biomass Accumulation of Sesame Varieties. *Agronomy*. 2018. V. 8. P.1-16.

47. Голуб Н.Б., Ситнік О.І., Будика К.Е. Вплив сполук сульфуру на процеси фотосинтезу та дихання у *Chlorella vulgaris*. Lviv Polytechnic National University Institutional Repository. 2012. С.153-157. URL: <http://ena.lp.edu.ua:8080/handle/ntb/18625>. (дата звернення: 15.04.2019)

48. Hu Q., Sommerfeld M., Jarvis E. Microalgal Triacylglycerols as Feedstocks for Biofuel Production. *Perspectives and Advances*. 2008. V. 54. P. 621–639.

49. Соловченко А.Е. Физиологическая роль накопления нейтральных липидов эукариотическими микроводорослями при стрессах. *Физиология растений*. 2012. Т. 59, №2. С.192-202.

50. Guschina I.A., Harwood J.L. Algal Lipids and Effect of the Environment on Their Biochemistry. *Lipids in Aquatic Ecosystems*. 2009. P. 1–24.

51. Голуб Н.Б. Технологічна схема культивування мікро водоростей завикористання газових викидів для одержання енергоносіїв. Інтегровані технології та енергозбереження. 2013. №1. С. 10-14.

52. Основы общей экологии: правило оптимума. URL: <http://www.bibliotekar.ru/ecologia-6/12.htm> (дата звернення: 15.04.2019)

53. Догадина Т. В., Комаристая В. П., Горбулин О. С., Рудась А. Н. *Общая и экспериментальная альгология*. Харків: ХНУ имени В. Н. Каразина, 2013. 148 с.

54. Левтун. И.И. Біотехнологія культивування мікроводоростей *Chlorella vulgaris* з підвищеним вмістом ліпідів: дис. ... канд. тех. наук : 03.00.20. Київ, 2017. 119 с.

55. SolverBook: свойства и все характеристики сероводорода. URL: <http://ru.solverbook.com/spravochnik/ximiya/soedineniya/serovodorod/> (дата звернення: 24.04.2019)

56. Zahra Amini Khoeyi. Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Aquaculture International*. 2011. Vol. 20. № 1. P. 153–157.

57. Dere Ş., Sivaci R.. Spectrophotometric Determination of Chlorophyll - A, B and Total Carotenoid Contents of Some Algae Species Using Different Solvents. *J. Of Botany*. 1998. V. 22. p. 13-17.

58. Belotti G. Effect of nitrogen and phosphorous starvations on *Chlorella vulgaris* lipid productivity and quantity under different tropic regimens for biodiesel production. *Am J Plant Sci*. 2013. № 4. P. 44–51.

59. Про затвердження Правил охорони праці під час роботи в хімічних лабораторіях: наказ Міністерство надзвичайних ситуацій України від 11.09.2012 р. № 1192. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z1648-12> (дата звернення: 26.05.2019).

60. Библиотека учебной информации: Інструкція з Охорони праці для лаборанта. URL: [http://kyrator.com.ua/index.php?option=com\\_content&view=article&id=872:nstrukcy-a-dlya-laboranta&catid=38&Itemid=148](http://kyrator.com.ua/index.php?option=com_content&view=article&id=872:nstrukcy-a-dlya-laboranta&catid=38&Itemid=148) (дата звернення: 26.05.2019).

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 [at 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 tricornutum* 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 unialga *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. Семененко, 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 Samkhanian // *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. Tredici M. R. Photobioreactors / Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation. — New York: Wiley-Interscience, 1999. — P. 395–419.

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. Установка для культивирования микроводорослей / Голуб Н.Б. (UA), Левтун И.И. (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. Установка для выращивания микроводорослей / Богданов Н.И. (RU), Куницын М.В. (RU) - Заявку подано: 08.10.2004; Оп. 27.02.2006 р. 107. Куртиева З.С. Влияние микробиологического препарата «эмбико» на ацидофицирующую активность корней огурца / З.С. Куртиева, 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 bursapastoris*) / Ю.С. Колісник, В.С. Кисличенко, В.Ю. Кузнєцова // 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. Levzun // *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. Paladino O. Airlift photo-bioreactors for *Chlorella vulgaris* cultivation in closed-loop zero waste biorefineries [Електронний ресурс] / O. Paladino, M. Neviani // *Biomass and Bioenergy.* – 2021. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953420304591>.

122. CO<sub>2</sub> capture from air by *Chlorella vulgaris* microalgae in an airlift photobioreactor / A. Sadeghizadeh, F. Farhad dad, L. Moghaddasi, R. Rahimi. // *Bioresour. Technol.* – 2017. – №243. – С. 441–447.

123. Левтун, І. І. Біотехнологія культивування мікроводоростей *Chlorella vulgaris* з підвищеним вмістом ліпідів : дис. ... канд. техн. наук : 03.00.20 – біотехнологія / Левтун Ігор Ігорович. – Київ, 2017. – 154 с.

124. Are there any true marine *Chlorella* species? Molecular phylogenetic assessment and ecology of marine *Chlorella*-like organisms, including a description of *Droopiella* gen. nov [Електронний ресурс] / Т. Darienko, С. Rad-Menéndez, С. Campbell, Т. Pröschold // *Systematics and biodiversity.* – 2019. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14772000.2019.1690597?scroll=top&needAccess=true>.

125. Bioethanol Production from Microalgae *Oscillatoria* sp Cultured in Blue Green 11 and Bold Basal Media [Электронный ресурс] / Hermansyah, R. AyuSakinah, Julinar та ін.] // SRICOENV. – 2018. – Режим доступу до ресурсу: [https://www.e3sconferences.org/articles/e3sconf/abs/2018/43/e3sconf\\_sriconv2018\\_03018/e3sconf\\_sriconv2018\\_03018.html](https://www.e3sconferences.org/articles/e3sconf/abs/2018/43/e3sconf_sriconv2018_03018/e3sconf_sriconv2018_03018.html).

126. Investigation of optimal condition for *Chlorella vulgaris* microalgae growth / [S. Daliry, A. Hallajani, J. Mohammadi Roshandeh та ін.]. // 2017. – №3. – С. 217–230.

127. Growth Medium Screening for *Chlorella vulgaris* Growth and Lipid Production [Электронный ресурс] / [Y. K. Wong, Y. H. Ho, K. S. Ho та ін.] // Aquaculture & Marine Biology. – 2017. – Режим доступу до ресурсу: <https://medcraveonline.com/JAMB/growth-medium-screening-for-chlorella-vulgaris-growth-and-lipid-production.html>.

128. World clock — current time in the world's 500 largest cities . – Режим доступу до ресурсу: <https://dateandtime.info/>