

ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ МІКРОВОДОРОСТЕЙ У БІОТЕХНОЛОГІЇ

**О.К. ЗОЛОТАРЬОВА, Є.І. ШНЮКОВА,
О.О. СИВАШ, Н.Ф. МИХАЙЛЕНКО**

**Під редакцією
д-ра біол. наук О.К. Золотарьової**

Рецензенти

д.б.н. І.В. Косаківська

д.б.н. П.М. Царенко

к.б.н. П.О. Мушак

*Рекомендовано до друку Вченою Радою Інституту ботаніки
ім. М.Г. Холодного НАН України*

ЗМІСТ

ВСТУП.....	3
1. ХАРАКТЕРИСТИКА МІКРОВОДОРОСТЕЙ – ОБ’ЄКТІВ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	9
1.1 Будова, розмноження синьозелених і зелених мікроводоростей – об’єктів біотехнологічних досліджень	10
1.2. Поширення мікроводоростей у природі	16
1.3. Мікроводорості як потенційне джерело унікальних біохімічних сполук	19
2. КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРОВОДОРОСТЕЙ	22
2.1. Характеристика розвитку мікроводоростей в умовах культури.....	22
2.2. Ріст мікроводоростей у періодичній культурі.....	28
2.3. Ріст мікроводоростей у неперервній культурі.....	33
3. ЖИВЛЕННЯ МІКРОВОДОРОСТЕЙ	36
3.1. Потреби мікроводоростей у поживних речовинах.....	36
3.2. Засвоєння мікроводоростями вуглецю	37
3.3. Мінеральне живлення.....	42
3.4. Характеристика живильних середовищ для культивування мікроводоростей.....	45
3.5. Склад мінеральних середовищ.....	47
3.6. Приготування живильних середовищ.....	48
3.7. Підтримка чистої культури і отримання посівного матеріалу.....	50
3.8. Колекційне забезпечення фонду штамів мікроводоростей.....	53
4. ФОТОБІОРЕАКТОРИ	55
4.1. Типи фотобіореакторів	55
4.2. Забезпечення світлом фотосинтетичного апарату мікроводоростей у процесі культивування	56
4.3. Конструкції існуючих фотореакторів для вирощування мікроводоростей.....	60
4.3.1. Бульбашкові та газліфтні фотобіореактори.....	60
4.3.2. Шляхи модернізації фотобіореакторів	62
4.3.3. Плоскопаралельні фотобіореактори	63
4.3.4. Трубчасті фотобіореактори.....	64
4.3.5. Реактори на основі коаксіальних циліндрів	73
4.3.6. Критерії оцінки продуктивності фотобіореакторів.....	75
5. ВИКОРИСТАННЯ МІКРОВОДОРОСТЕЙ В АЛЬТЕРНАТИВНІЙ ЕНЕРГЕТИЦІ	80
5.1. Ефективність фотосинтетичної трансформації енергії	80
5.2. Молекулярний водень – екологічно безпечний для довкілля поновлюваний носій енергії.....	86
5.2.1. Синьозелені і зелені мікроводорості – об’єкти біологічного способу отримання молекулярного водню.....	87
5.3. Ліпіди мікроводоростей та їх комерційне застосування.....	95
5.4. Мікроводорість <i>Botryococcus braunii</i> Kütz. – продуцент вуглеводнів. Походження нафти.....	122
5.4.1. Вміст вуглеводнів у <i>Botryococcus braunii</i>	126
5.4.2. Різноманіття вуглеводнів <i>Botryococcus braunii</i>	127
5.4.3. Вивчення біотехнологічних перспектив культивування <i>Botryococcus braunii</i>	129
5.4.4. Можлива роль <i>Botryococcus braunii</i> в утворенні нафти.....	131
5.5. Біодизель як альтернативне паливо	133
5.5.1. Технологія виробництва біодизелю.....	136
5.5.2. Визначення якості біодизелю	141
5.5.3. Екологічні аспекти застосування і виробництва біодизелю.....	145
5.5.4. Виробництво біодизелю з водоростей.....	146
ЗАВЕРШЕННЯ.....	150
ЛІТЕРАТУРА	152

ВСТУП

Починаючи з середини ХХ століття почало з'являтися переконання в тому, що історично сформована ідеологія сучасного виробництва веде в глухий кут. Однією з концепцій, що була висунута цього часу як перша широкомасштабна реакція на розуміння хибності екстенсивного розвитку суспільства і зростаючі екологічні проблеми, що почали охоплювати великі регіони, була так звана теорія безвідходного виробництва. Підприємства оснащували очисними спорудами та засобами первинної переробки відходів виробництва для потреб людини. При цьому, однак, лишалася не усунутою основна причина екологічної кризи, що стає все більш очевидною і масштабною, – це природоруйнівний характер нинішнього виробництва й споживання, тобто експлуатація природного середовища без урахування життєво важливих взаємозв'язків і взаємозалежностей, які в ньому склалися (Козин, Волков, 2002).

Практично всі сучасні технології неприродні і руйнівні, вони включають у себе видобування, збагачення, плавлення, розпилювання, розрізання і т. ін. Навпаки, природні процеси не мають нічого спільного з сучасними технологічними, вони гармонійні і нешкідливі для оточення. Наприклад, рослини збирають сонячну енергію і трансформують її в електронних пристроях – фотосинтетичних реакційних центрах для перетворення на інші форми. Далі вони використовують цю енергію для того, щоб задіяти інші молекулярні машини, які в кінцевому результаті “створюють” стебло, листок, гілку, стовбур дерева. І все це відбувається без використання високих температур, виділення шкідливих речовин та інших постійних атрибутів сучасного виробництва.

З точки зору сучасних технологій, біологічні системи – це своєрідні рекордсмени. По-перше, вони мають найвищу інформаційну ємність (кількість накопиченої інформації на одиницю об'єму). По-друге, у живій клітині продукується більше речовини, ніж на будь-якому заводі (у перерахунку на одиницю маси). Причому каталізатори біопроцесів – ферменти – у такому біореакторі (або біохімічному заводі) мають рекордно високу вибірковість дії – селективність.

Нарешті, потік енергії в біоенергетиці (наприклад, при фотосинтезі або м'язовому скороченні) вищий, ніж у будь-яких інших системах. При цьому дуже важливо відмітити, що перетворення енергії електромагнітного випромінювання або хімічної енергії на механічну відбувається за дуже низьких значень температури та тиску, на відміну від величезних температур і тисків, що використовують у хімічному виробництві.

Таким чином, технології, за рахунок яких розвиваються живі істоти, є дійсно високими технологіями, а технологічні процеси відбуваються на молекулярному рівні. Екологічна

криза призвела до формування нової концепції розвитку – так званої “нанотехнологічної революції”. Префікс “нано-” означає мільярдну частину, що вказує на перехід на молекулярний і супрамолекулярний рівень.

Одним з напрямків нанотехнологічної революції є розвиток біотехнологій. За оцінками ряду спеціалістів, у найближчі роки близько 20 % продуктів, які отримують шляхом хімічного синтезу, можна буде виробляти за допомогою нових біотехнологій, що знизить основні виробничі затрати на технологічне обладнання на 20 %, а енерговитрати мінімум на 50 %.

Біотехнологію можна визначити як ряд технологій старих і нових, що включають використання біологічних процесів живих організмів у промисловості, сільському господарстві та інших сферах прикладної діяльності. Старі методи ґрунтуються на використанні ферментів у біологічних реакціях. До нових методів біотехнології відносять біологічні процеси, які базуються на генетичному та клітинному конструюванні. Останнім часом бурхливо розвиваються біотехнології, в яких використовуються фотоавтотрофи – організми, для існування яких досить тільки простих речовин і енергії сонячного світла, зокрема мікроводорості (Волова, 1999).

Мікроводорості – широка група фотосинтезуючих організмів, яка включає ціанобактерії, діатомові, одноклітинні зелені і деякі інші види водоростей. Вони можуть розвиватись у складних агрокліматичних умовах і продукувати цілу низку корисних продуктів: жири, білки, вуглеводи, барвники, біологічно активні сполуки та ін. Особливу зацікавленість викликає використання мікроводоростей як організмів, здатних запасати сонячну енергію за рахунок фотосинтезу, оскільки ефективність перетворення енергії мікроводоростями значно вища, ніж вищими рослинами.

Значення культури водоростей у фізіолого-біохімічних дослідженнях загальновідоме, а той факт, що водорості є одними з найбільш ефективних перетворювачів сонячної енергії, робить їх культивування дуже перспективним. Використання фотосинтетичного принципу трансформації сонячної енергії для створення сучасної альтернативної енергетики останніми роками викликало величезну зацікавленість через кризу традиційної невідновлюваної енергетики.

Технологічна біоенергетика сьогодні розгортається в декількох напрямках:

- 1) переробка біомаси, яка накопичується в результаті фотосинтезу, на дешеве і висококалорійне паливо – метан та інші вуглеводні, етанол, бутанол та ін.;
- 2) модифікації самого процесу фотосинтезу, внаслідок чого енергія світла з максимальною ефективністю спрямовується на утворення водню або іншого палива, обминаючи стадію фотоасиміляції CO_2 і синтезу компонентів клітини.

Ідея безпосереднього перетворення енергії Сонця на електричну енергію знайшла своє втілення в технології напівпровідникових батарей. Зараз ведуться перспективні розробки по використанню фотосинтезуючих біосистем (біофотоелектричних перетворювачів енергії) як первинного генератора електрики.

Ресурси біомаси, у першу чергу рослинної, у світі величезні і оцінюються в 100 млрд т сухої маси за рік. Лише незначна її частина витрачається людством на енергетичні потреби, але й вона дає до 14 % енергії, яка використовується у світі. Біомаса – це не тільки відновлюване і майже безкоштовне джерело енергії, але й альтернатива використанню корисних копалин, запаси яких швидко зменшуються.

Високими темпами зростають обсяги біомаси, яку переробляють на етанол – екологічно чисте паливо, що утворює при згоранні лише CO_2 і H_2O . Етанол використовується у двигунах внутрішнього згорання в чистому вигляді або як 10-20%-на домішка до бензину (газохол). У Бразилії вже до 1983 р. 75 % автомобілів працювали на 95%-ому етанолі, решта – на газохолі. У США збираються замінити 10 % бензину, який споживається, на етанол. Широке впровадження останнього планується в країнах Західної Європи.

На значних посівних площах планується вирощувати сільськогосподарські культури, призначені для біотехнологічної переробки на етанол. В умовах дефіциту посівних площ виникає проблема, яка вже в наші дні актуальна для Бразилії і виражається дилемою: продовольча продукція або енергія. Виробництво етанолу з рослинної сировини не є безвідходним: на кожний літр спирту доводиться 12-14 л стічних вод з високою концентрацією відходів, небезпечних для природних екосистем. Проблема раціональної переробки цих відходів не вирішена.

Іншим важливим шляхом утилізації сільськогосподарських відходів є отримання метану. Його отримують у вигляді біогазу – суміші метану і CO_2 . Присутність CO_2 обмежує теплотворну здатність біогазу як палива, яка в залежності від співвідношення CH_4/CO_2 складає 20,9-33,4 кДж/м³. Вміст метану в біогазі варіює від 50 до 85 %.

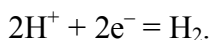
Процес метаноутворення відрізняється високою ефективністю: до 90-95 % вуглецю, який при цьому використовується, переходить у метан. Тому метаногенні асоціації з успіхом застосовують для очищення стічних вод від органічних забруднень з одночасним отриманням висококалорійного палива. До 5-10 % спожитого вуглецю перетворюється на біомасу, яка також знаходить застосування. Використовують як рідко-, так і твердофазні процеси отримання біогазу (біогазифікація).

Разом з біогазом метаногенні асоціації утворюють інші цінні продукти, наприклад вітамін B_{12} . Після переробки органічного субстрату на біогаз залишається матеріал, який є цінним мінеральним (азотним і фосфорним) добривом.

Отримання біогазу – процес, який відрізняється простотою устаткування і доступністю сировини, вимагає невеликих капіталовкладень. У Китаї, Індії та в інших країнах експлуатуються невеликі установки, в які вносять підручний матеріал (солому, гній та ін.), що виключає витрати на доставку сировини. У Китаї діє понад 7 млн малих установок ємністю 10-15 л, достатніх для задоволення енергетичних потреб сім'ї з п'яти осіб.

Отримання водню як палива поки знаходиться на рівні пошукових розробок. Це абсолютно чисте паливо, яке дає при згоранні лише H_2O , відрізняється виключно високою теплотворною здатністю – 143 кДж/г. Хімічний та електрохімічний способи отримання H_2 неекономічні, тому раціональним є використання мікроорганізмів, здатних виділяти водень. Такою здатністю володіють аеробні й анаеробні хемотрофні бактерії, пурпурні й зелені фототрофні бактерії, ціанобактерії, різні водорості та деякі найпростіші (Волова и др., 1985; Бородин и др., 2000; Stencel, 2000; Серебрякова и др., 2001a; 2001b).

Процес протікає за участі гідрогенази або нітрогенази (Lindblad, Sellstedt, 1990). Гідрогеназа – фермент, що містить FeS-центри. Вона каталізує реакцію



Одна з технологічних можливостей ґрунтується на включенні ізольованої гідрогенази до складу штучних H_2 -генеруючих систем. Складною проблемою є нестабільність ізольованого ферменту і швидке інгібування його активності воднем (продуктом реакції) і киснем. Підвищення стабільності гідрогенази може бути досягнуте її іммобілізацією, яка запобігає інгібуванню гідрогенази киснем.

Запропоновано багато варіантів модельних систем, які каталізують утворення водню з води за рахунок енергії світла. Ці системи розрізняються механізмом уловлювання енергії світла і містять хлоропласти або ізольований з них хлорофіл, а також відновлені нікотинамідні нуклеотиди. Деякі системи разом з воднем утворюють кисень: у цьому випадку мова йде про біофотоліз води. Прикладом може служити система хлоропласт – ферредоксин – гідрогеназа. Ферредоксин служить проміжним переносником електронів від фотосинтетичного ланцюга хлоропластів до гідрогенази, яка додається. Водень отримують також із застосуванням цілих клітин мікроорганізмів, стабільність яких зростає при їх іммобілізації. Високоєфективними продуцентами H_2 є пурпурні фототрофні бактерії, наприклад *Rhodospseudomonas* sp., які при іммобілізації в агарозному гелі дають до 180 мкмоль H_2 за 1 годину в перерахунку на 1 мг бактеріохлорофілу. Важливим напрямком робіт є пошук продуцентів H_2 зі стійкою до O_2 гідрогеназою.

Іншим ферментом, що каталізує виділення водню, є нітрогеназа (Lindblad, 1999; Lindberg et al., 2004). В усіх мікроорганізмах нітрогеназа складається з двох компонентів, а

саме з MoFeS-протеїду (молібдофередоксину) і FeS-протеїду (азофередоксину). Основною функцією нітрогенази є відновлення молекулярного азоту:



За відсутності основного субстрату (N_2) нітрогеназа каталізує енергозалежне відновлення H^+ з утворенням H_2 . Перемикання ферменту з одного режиму роботи на інший є технологічною проблемою. Одним зі шляхів її вирішення є отримання штамів мікроорганізмів з нітрогеназою, яка не утилізує азот.

В Японії отриманий штам *Anabaena* sp., який здійснює біофотоліз води в режимі, нечутливому до H_2 , O_2 і N_2 . Підвищенню ефективності біофотолізу води сприяє чергування періодів функціонування біооб'єкту як продуцента H_2 і O_2 з періодами “відпочинку”, коли клітини фотоасимілюють CO_2 (що вводиться на цей період у середовище культивування). Можливе комбінування процесів отримання H_2 та інших цінних продуктів. Зокрема, представники роду *Clostridium* продукують органічні розчинники поряд з активною роботою гідрогенази. Таким чином, запропоновані різноманітні проекти систем для отримання водню з використанням біооб'єктів з метою більш повного перетворення енергії світла на енергію хімічного зв'язку в молекулі H_2 .

Вельми привабливою для цілого ряду фірм і підприємств є перспектива використання мікроводоростей як сировини для виробництва біодизельного палива. Основними відмінностями і перевагами біодизельного палива є його здатність до біодеструкції, відновлюваність і екологічна чистота. Потрапляючи у воду чи ґрунт, біодизель зазнає практично повної біодеградації менш, ніж за один місяць. Метиліві / етилові ефіри не містять у своєму складі сірку і, відповідно, викиди не містять її діоксиду. Розміри частинок викидів на 30–40 % менші, ніж у звичайного дизельного палива. При згоранні біодизелю виділяється така ж кількість вуглекислого газу, що була поглинена з атмосфери рослиною, яка була вихідною сировиною для виробництва олії, за весь період її життя.

Мікроводорості здатні накопичувати значну кількість ліпідів і жирних кислот (від 5 до 30 %, а в деяких випадках до 80-90 % сухої біомаси) як компонентів фотосинтезуючих мембран, запасних сполук і метаболітів. Акумуляція ліпідів у мікроводоростях відбувається зазвичай у періоди стресового росту, зокрема в умовах дефіциту основних поживних речовин (азоту або сірки). Тому вміст ліпідів у біомасі водоростей може бути підвищений за рахунок програмованого варіювання умов вирощування. Враховуючи те, що продуктивність мікроводоростей набагато вища за будь-яку олійну культуру, потенційний вихід біодизельного палива з водоростей перевищує вихід із соняшника у 100 разів, з ріпаку – у 80, і з плодів олійної пальми – у 16 разів.

Актуальною для технологічної біоенергетики залишається проблема підвищення ефективності фотосинтезу в культурних рослинах. Теоретично розрахована ефективність фотосинтезу (коефіцієнт перетворення світлової енергії на хімічну енергію органічних речовин) наближається до 15 %. Проте фактично найбільш продуктивні культурні рослини запасують не більше 1,5-2 % енергії світла, яке падає на поверхню листка. Для вирішення цієї проблеми розроблені такі підходи: 1) підвищення коефіцієнта перетворення сонячної енергії до 4-5 % за рахунок збільшення площі листя та їх раннього формування; 2) втручання в системи регуляції фотосинтезу – збалансоване використання фітогормонів, трансплантація регуляторних генів; 3) збільшення швидкості росту рослин за рахунок оптимізації водного й мінерального живлення, що призведе до підвищення їх фотосинтетичної активності; 4) збільшення числа хлоропластів у клітині на одиницю площі листка; 5) встановлення оптимального співвідношення між функціонуючими реакційними центрами хлорофілу і проміжними переносниками електронів, наприклад, цитохромами; 6) збільшення швидкості перенесення електронів між фотосистемами I і II та ефективності сполучення між транспортом електронів і синтезом АТФ. Радикальним засобом максимізації ефективності фотосинтезу було б створення штучних фотосистем, що імітують основні блоки фотосинтетичного апарату живих організмів, але для впровадження подібних перетворювачів енергії буде потрібно як мінімум декілька десятиліть.

1. ХАРАКТЕРИСТИКА МІКРОВОДОРОСТЕЙ – ОБ'ЄКТІВ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Останнім часом завдяки розвитку біотехнології відкрилися перспективи широкого використання унікальних у біохімічному відношенні об'єктів – мікроскопічних водоростей, головним чином з числа синьозелених (ціанобактерій, Cyanophyta) і одноклітинних зелених (Chlorophyta).

Згідно з особливостями організації клітин, водорості поділяються на дві відмінні групи: прокаріоти, найбільш стародавні примітивні без'ядерні організми, та еукаріоти, більш складної структурної організації, клітини яких мають оформлені ядра.

Серед водоростей найбільш стародавньою прокаріотичною групою є мікроскопічні організми – синьозелені водорості. Назва цього відділу визначається найхарактернішим синьо-зеленим забарвленням клітин цих організмів.

Проф. Б.В. Громов (1996), аналізуючи період появи синьозелених водоростей на планеті, наводить дані стосовно знаходження їх залишків у кременях, які були взяті на різних континентах і мали різний вік. Найбільш стародавніми були кремені з Австралії, вік яких становить близько 3500 млн років. Давніших за них осадових порід знайдено не було. У кременях з Австралії виявлено сім різних морфологічних типів (видів) прокаріот, тобто в той період вже існували прокаріоти зі складною морфологічною структурою, схожі з синьозеленими водоростями.

Синьозелені водорості відносяться до найбільш примітивних серед існуючих рослин, які містять хлорофіл, і вважаються одними з перших фотосинтетиків планети. На думку Б.В. Громова, їх присутність у стародавніх докембрійських відкладеннях свідчить про те, що в земній атмосфері вже був присутній кисень, походження якого пояснюється здатністю синьозелених водоростей здійснювати окиснений фотосинтез, тобто продукувати молекулярний кисень. Діяльність синьозелених водоростей поступово забезпечила формування кисневої атмосфери, в умовах якої стало можливим подальше виникнення рослин і тварин.

У той час як прокаріоти з'явилися на Землі 3-4 млрд років тому, еукаріоти, за різними оцінками, виникли тільки 2,5-1,5 млрд років тому (Painter, 1983). На цей час завдяки фотосинтетичній діяльності хлорофілвмісних прокаріот кількість кисню в атмосфері складала ~ 0,2 % і в наступному підвищувалася завдяки спільній фотосинтетичній активності як синьозелених водоростей, так і водоростей-фотосинтетиків еукаріотичного типу організації (Громов, 1996).

1.1 Будова, розмноження синьозелених і зелених мікроводоростей – об'єктів біотехнологічних досліджень

Культивування ряду мікроскопічних синьозелених і зелених водоростей створило умови для детального дослідження їх розвитку, вивчення морфологічних, фізіологічних, біохімічних особливостей. Це, у свою чергу, дозволило виявити серед культивованих мікроводоростей окремі види, яким властиві високі темпи росту і які мають здатність синтезувати унікальні біохімічні компоненти.

У наш час ряд синьозелених і зелених мікроводоростей культивується в спеціально обладнаних приміщеннях наукових і учбових закладів біологічного й біотехнологічного профілів, де створені та підтримуються колекції їх культур. Здебільшого це представники мікроводоростей класу Chroococcophyceae – хроококових (одноклітинних або колоніальних) і Hormogoniophyceae – гормогонієвих (багатоклітинних) синьозелених мікроводоростей, а також мікроскопічних зелених.

Хроококові синьозелені водорості (*Synechococcus* Näg., *Synechocystis* Sauv., *Microcystis* (Kütz.) Elenk., *Anacystis* Menegh. та деякі інші), а також гормогонієві (*Anabaena* Bory, *Aphanothece* Näg., *Calothrix* (Ag.) V. Poljansk., *Gloeocapsa* (Kütz.) Hollerb., *Lyngbya* Ag., *Nostoc* Adan., *Oscillatoria* Vauch., *Phormidium* Kütz., *Spirulina* Turp., *Tolypothrix* Kütz., тощо) широко культивуються й досліджуються з метою встановлення їх можливого використання як об'єктів біотехнологічних процесів. Деякі синьозелені водорості, головним чином *Spirulina*, а також *Nostoc*, *Synechococcus*, *Synechocystis* та ряд інших, вирощуються в напіввиробничих і виробничих умовах, а їх біомаса вже застосовується в господарській діяльності – у харчовій промисловості, фармакології, медицині, тощо (Биохимия синезеленых водорослей, 1978; Micro-algal biotechnology, 1988; Henrikson, 1989; Андреюк и др., 1990; Варфоломеев, Калюжный, 1990; Fox, 1996; Spolaore et al., 2006).

Орієнтиром у різноманітних наукових напрямках, пов'язаних з таксономічною приналежністю, складністю структурної організації та біохімічними особливостями мікро- і макроводоростей різного еволюційного рівня розвитку, визначенням ролі водоростей у природі та їх господарського значення, можуть служити фундаментальні наукові публікації спеціалістів-альгологів, які протягом багатьох років досліджують ці об'єкти (Голлербах и др., 1953; Визначник прісноводних водоростей..., 1984; Водоросли. Справочник, 1989; Кондратьева, 1989, 1995, 2001; Henrikson, 1989; Андреюк и др., 1990; Komárek, Anagnostidis, 1998, 2005; Разнообразие..., 2000; Масюк и др., 2007).

Синьозелені хроококові мікроскопічні водорості, такі як види родів *Microcystis*, *Synechococcus*, *Synechocystis* – це одноклітинні, які вільно плавають, або колоніальні

організми. Їх клітини мають різноманітну форму, але найчастіше кулясту та еліпсоїдну декількох типів.

Гормогонієві Cyanophyta з родів *Anabaena*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Spirulina*, *Tolypothrix* та ін. мають однорядні, рідше багаторядні ниткоподібні слані. Клітини цих водоростей з'єднуються одна з одною плазмодесмами. Нитки прості, дуже рідко розгалужені, поодинокі або зібрані пучками або в кулясті колонії. Іноді нитки здатні поволі ковзати у воді і здійснювати плавні коливальні рухи. Вони можуть утворювати колонії з одноклітинними або багатоклітинними ціаноїдами. Ці водорості мають трихомальну будову тіла, тобто обов'язковим елементом їх будови є ниткуватий утвір – трихом, який складається з одного, рідше з двох або багатьох рядів клітин.

Синьозеленим водоростям не притаманна джгутикова, тобто монадна форма будови. Окремим представникам цього відділу властиве ковзне пересування.

Поряд з рівнем організації цих об'єктів необхідно враховувати також рівень їх індивідуальності. Індивідом, у розумінні “особини”, “організму” в одноклітинних синьозелених водоростей є клітина, яка живе вільно, самотійно. У той же час у багатоклітинних Cyanophyta індивідом є нитка, яка містить один трихом. Це “прості” індивіди. Якщо нитка включає більше одного трихому, а також найбільш цілісні колонії, вони визначаються як колоніальні індивіди, або колоніальні організми.

Розмір клітин хрооококових мікроскопічних синьозелених водоростей від 0,5 до 60 мкм завширшки (найчастіше 2-5 мкм) та від 1,5 до 100 мкм завдовжки (найчастіше 3-15 мкм).

Клітини, які утворюють нитчасті багатоклітинні (трихомальні) організми, бувають чотковидні, перетягнуті (перешнуровані) біля поперечних перегородок або циліндричні, які не перетягнуті біля цих перегородок. Клітини гормогонієвих синьозелених водоростей відрізняються за фізіологічними функціями: вегетативні, азотфіксуючі, здатні або нездатні до фотосинтетичної активності та ін. Крім вегетативних клітин у деяких гормогонієвих є гетероцисти: клітини з двома порами, які виникають із серединних вегетативних, і з однією порою, які походять від кінцевих вегетативних клітин трихомів. Гетероцистам властива висока нітрогеназна активність, що визначає їх азотфіксуючу здатність. Деякі синьозелені водорості можуть утворювати спори – акінети. Характерною рисою акінетоутворення є відкладання нових шарів оболонки. Функція акінет полягає в забезпеченні розмноження водоростей і виживання за несприятливих умов. Вони мають здатність накопичувати запасні поліглікани, можуть містити поліедральні тільця, ліпідні та ціанофіцинові гранули.

Незважаючи на те, що в синьозелених водоростей не сформувались оточене оболонкою ядро і такі органели, як хлоропласти і мітохондрії, вакуолі, наповнені клітинним соком, їм властива висока морфологічна складність. Їх клітинні стінки ригідні, клітини оточені

плазматичною і зовнішньою мембранами, між якими розташований жорсткий шар мукополімеру муреїну. Це складна молекула, побудована з одного полімеру, який забезпечує опорну та захисну функції.

Крім клітинної стінки синьозелені водорості здебільшого вкриті слизовою обгорткою, яка є продуктом екскреції її складових компонентів з клітин водоростей.

Типові ядра, оточені ядерною оболонкою, у синьозелених водоростей відсутні. ДНК як носій генетичної інформації локалізована у фібрилярно-зернистій нуклеоплазматичній ділянці клітини в хроматинових елементах, які розглядаються як ядерні еквіваленти. При центральному розміщенні в клітині ДНК ця ділянка клітини носить назву нуклеоплазми. Як у центральній, так і в периферичній частині клітин локалізуються рибосоми – рибонуклеопротейдні структури, які мають вигляд гранул розміром 10-15 мкм. За нуклеотидним складом ДНК синьозелених водоростей майже не відрізняється від ДНК інших організмів.

У представників *Cyanophyta* ще не сформовані типові хлоропласти, проте навіть за їх відсутності добре розвинена фотосинтетична система. Пігменти локалізовані в пластинчастих ламелярних тилакоїдних мембранах, розташованих у цитоплазмі. Вони синтезують лише один хлорофіл *a* (хлорофіл *b* відсутній), каротиноїди (каротин і ксантофіли). Характерна наявність фікобілінових пігментів – фікоціаніну, алофікоціаніну, фікоеритрину.

У клітинах ряду видів присутні по одній або більше газових вакуолей, які забезпечують зміни плавучості водоростей, містяться поліедральні тіла – карбоксисоми, які вважаються аналогами піреноїдів, волютинові поліфосфатні гранули, гранули запасних полігліканів, ліпоїдні включення.

Подібна клітинна організація властива і для грамнегативних бактерій. Існує точка зору щодо спорідненості цих груп організмів, яка ґрунтується на їх цитологічній схожості (низький рівень клітинної диференціації, відсутність хлоропластів, диференційованого ядра та складно побудованого талому, надмірне виділення слизових продуктів, часто у вигляді чохлів, у які занурені клітини або трихоми, відсутність диференційованих органів відтворення. Підтвердженням цього служать також результати електронно-мікроскопічного та біохімічного аналізу комплексно побудованих та хімічно різноманітних макромолекулярних компонентів, що входять до складу клітинних стінок цих груп організмів. Крім того, вони синтезують близькі за структурною організацією форми запасних полісахаридів.

Під циклом розвитку конкретного виду розуміють біологічні процеси, які протікають між певною стадією розвитку організму до тієї ж стадії її потомства. У мікроскопічних

синьозелених водоростей, життєві цикли яких включають етапи розвитку тільки однієї особини і які розмножуються шляхом простого поділу, цикл розвитку “простий”.

Розмноження хроококових синьозелених мікроводоростей вегетативне, нестатеве. Статеве розмноження не виявлене. Їх клітини діляться надвоє, в одній або декількох площинах, рівним, рідше нерівним поділом, у результаті якого клітини діляться на неоднакові частини. Останній варіант спостерігається в представників родів *Synechococcus* і *Microcystis*.

Для гормогонієвих характерний поділ клітин в одній площині, поперечний до повздовжньої осі трихому. Вегетативне розмноження в них, як правило, відбувається шляхом випадкової фрагментації, гормогоніями, які можуть утворюватись по всій довжині трихому шляхом розпадання його на зовнішні невидозмінені частини. Ботаніки розпізнають первинні гормогонії, які утворюються в результаті проростання акінет (спочиваючих спор, які утворюються в деяких гормогонієвих синьозелених водоростей), і вторинні гормогонії, які виникли шляхом фрагментації трихомів. Найбільш характерне для гормогонієвих водоростей розмноження за допомогою гормогоній.

Відділ Chlorophyta нараховує понад 20 000 видів еукаріотичних мікро- і макроскопічних водоростей.

Серед зелених мікроводоростей, як і серед синьозелених, об'єктами біотехнологічних досліджень є незначна їх частина. Це головним чином представники Chlamydomonales Fritsch (види *Chlamydomonas* Ehr.), Dunaliellales Ettl (*Dunaliella* Teod.), Chlorococcales Marchand (види *Chlorella* Beijer., *Chlorococcum* Menegh., *Botryococcus* Kütz.), тощо. Здебільшого це одноклітинні, колоніальні або ценобіальні форми.

Одноклітинні водорості, в яких домінує нерухома стадія, а рухливість або повністю відсутня (наприклад, *Chlorella*), або обмежена репродуктивними фазами (*Chlorococcum*), мають кокоїдний тип будови. Кокоїдні форми зустрічаються в більшості класів водоростей.

Клітини *Chlorella vulgaris* кулясті, 5-10 мкм у діаметрі, мають чашоподібний хлоропласт. Це одноядерні водорості, розмір ядра яких близько 1 мкм.

Форма клітин *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. куляста або яйцевидна, 14-22 мкм у діаметрі з одним ядром. На передньому кінці клітини розташовуються два джгутики, які в 1,5-2 рази довші за самі клітини. Біля основи джгутиків розташовані дві пульсуючі вакуолі. Хлоропласт процельний, гладкий з одним крупним піреноїдом, який має крохмальну сферу.

У одноклітинної зеленої мікроводорості *Dunaliella salina* Teod. клітини не сплюснуті, а яйцевидні або еліпсоїдні без відособленої клітинної стінки, з двома джгутиками. Хлоропласт цих водоростей процельний з піреноїдом, пульсуючі вакуолі в них відсутні.

Зелена водорість *Botryococcus braunii* Kütz. утворює малопрозорі колонії від 100 до 500 мкм у діаметрі, жовтуватого або червонувато-бурого кольору з негладкою поверхнею, які вільно плавають. Клітини цих водоростей овальні, 6-10 мкм завдовжки, вони мають постійний пластинчастий хлоропласт. Розташування клітин у колонії правильно радіальне, при цьому кожна клітина більш-менш глибоко занурена в слизову воронку, яка продовжується вузьким кінцем у вигляді тяжа до центру колонії, де об'єднується з іншими такими ж тяжами.

Кількість, розміри і форма ядерців зелених мікроводоростей коливається залежно від життєвого циклу.

У мікроскопічних зелених водоростей здебільшого утворюються клітинні стінки, які забезпечують зберігання більш-менш постійної форми клітин. Вони мають декілька шарів, а основним їх компонентом здебільшого є целюлоза. Одноклітинна мікроводорість *Chlamydomonas reinhardtii* має еластичну клітинну стінку, яка складається з семи шарів. Вона щільно прилягає до протопласта або дещо відстоїть від нього в задній частині клітини. Клітинна стінка *Chlamydomonas* не містить целюлози, до її складу входить глікопротеїн. У клітинних стінках *Chlorella* крім внутрішнього целюлозного знайдений спорополеніновий шар, який складається з окиснених полімерів каротину або каротиноїдних ефірів. Останні входять до складу клітинних стінок спор та пилку вищих рослин. У той же час види *Dunaliella* не мають клітинної стінки. На передньому полюсі їх клітин є маленький горбочок (плазматична папіла), біля основи якого є отвір, крізь який виходять джгутики.

Хлоропласти зелених мікроводоростей відрізняються за формою, розмірами і положенням у клітині. Наприклад, у багатьох видів *Chlamydomonas* хлоропласт один. Хлоропласти зелених водоростей здебільшого містять занурені піреноїди, число і локалізація яких видоспецифічні. Ламелярна система хлоропласта нерідко проникає в піреноїд. У той же час піреноїди *Chlamydomonas chlamydogama* Bold позбавлені ламелярної системи.

Хлорококові водорості містять звичайно декілька мітохондрій, проте в деяких з них (види роду *Chlorella*) присутня лише одна мітохондрія. Цитоплазма пронизана системою каналців ендоплазматичного ретикулума, які місцями розширюються, утворюючи цистерни або пухирці з мембраною, яка несе рибосоми. У *Chlorella* розгалужена система каналців спостерігається на периферії клітини вздовж плазмалемі. Крім каналців ендоплазматичного ретикулума, клітини хлорококових водоростей містять мікротрубочки, число і місцезнаходження яких у клітині досить мінливе і залежить від функціонального стану. У *Chlorella* вони виникають перед самим поділом ядра і зникають відразу ж після закінчення цитокінезу. З цитоплазматичних тілець виявлені пероксисоми (види *Chlorella*), які складаються з дрібнозернистого матеріалу і містять фермент гліколатдегідрогеназу.

Хлоропласти здебільшого мають різні відтінки зеленого кольору. Їх забарвлення обумовлене наявністю і різним співвідношенням хлорофілів – a і b , α -, β -, γ -, ϵ -каротинів, а також ксантофілів: лютеїну, віолаксантину, неоксантину, зеаксантину, антераксантину. Неприятливі умови, такі як нестача біогенних елементів, підвищення концентрацій хлористого натрію, тощо призводять до суттєвих змін співвідношення компонентного складу пігментів у клітинах водоростей у напрямку переважання каротиноїдів. При цьому такі водорості як *Dunaliella salina* і *Chlamydomonas nivalis* набувають помаранчево-червоного кольору. Ці властивості використовуються біотехнологами для створення умов переважного біосинтезу водоростями певних біохімічних компонентів.

Основним запасним полімером більшості зелених водоростей є крохмаль. Як і у вищих рослин, він складається з амілози та амілопектину в різних співвідношеннях. Крохмаль утворює навкруги піреноїда обкладку, суцільну або з окремих зерен. Так, у хлорококової водорості *Chlorella* крохмаль концентрується в основному навколо піреноїдів, проте в деяких мікроводоростей, наприклад в *Ankistrodesmus*, піреноїди зовсім не мають крохмальної обкладки. Крім крохмалю окремі види зелених мікроводоростей, наприклад *Botryococcus braunii*, можуть накопичувати вуглеводні, у *Dunaliella* у великих кількостях синтезуються вторинні каротиноїди, вміст яких досягає великих кількостей, перевищуючи пул крохмалю. У той же час гіпергалобна мікроводорість *Dunaliella salina* у великих кількостях синтезує гліцерин.

Деякі види синьозелених і зелених мікроводоростей здатні продукувати унікальні екзополісахариди з потенційно корисними властивостями. Ці полімери формують слизові піхви, чохла, виділяються в оточуюче середовище. Позаклітинні вуглеводи надзвичайно важливі для життєдіяльності водоростей. Вони забезпечують такі функції, як бар'єрна між клітинами і оточуючим середовищем, протекторна проти висушування, запобігання дії стресів в екстремальних умовах. Завдяки своїй аніонній природі вони відіграють важливу роль в іммобілізації іонів металів, незамінних або шкідливих для їх життя, що призводить до зниження їх концентрацій до мінімальних і є однією з актуальних екологічних проблем. При цьому отримується біомаса водоростей або препаратів екзополісахаридів, збагачена на певні іони металів.

Розмножуються зелені водорості нестатевим і статевим шляхом, за допомогою вегетативних і спеціалізованих клітин. В одноклітинних зелених водоростей роду *Dunaliella*, які не мають клітинної стінки, нестатеве вегетативне розмноження відбувається шляхом поділу клітини надвоє. Статевий процес у *D. salina* представляє собою гологамію, у результаті якої утворюється диплоїдна зигота. При проростанні зиготи відбувається редукційний поділ ядра, і вегетативні клітини *D. salina* мають гаплоїдний набір хромосом.

Спорофіт представлений одноклітинною зигоспорою, а вегетативні клітини являють собою гаметофіти. Отже, усі покоління *D. salina* існують у стадії гаметофіта.

У деяких водоростей, наприклад у *Chlorella*, розмноження здійснюється лише одним способом, за допомогою спеціалізованих клітин – автоспор, які вивільнюються зі спорангію.

Джгутикові форми представляють вищий ступінь одноклітинної організації. Джгутикові або кокоїдні одноклітинні водорості можуть тимчасово переходити в стадію пальмели – стан, коли джгутики, якщо вони були в нормі, втрачаються і клітини, занурені в загальний слизовий матрикс, послідовно вегетативно діляться. Вегетативне розмноження в них відбувається по-різному: у рухомому стані, якому не передуює диференціація клітин; у рухомому стані з частковою диференціацією клітин; у нерухомому частково диференційованому (пальмелевидному) стані; у нерухомому, повністю дедиференційованому інцистуванням стані.

Під час розмноження *Chlamydomonas* при повздовжньому поділі клітин дочірні клітини виробляють власні воронки, а материнська воронка розтягується, потім ослизнюється без певної форми і розривається під тиском протопласта, який розділюється, а також унаслідок рухомості нових клітин усередині материнської оболонки. У деяких *Chlamydomonas* розширення і ослизнення клітинної стінки досягає великих масштабів. При розпаданні колонії на більш малі вторинні колонії останні утримуються деякий час разом з рештками слизових тяжів, які іноді витягуються потім у довгі нитки. Крім поділу клітин відоме також утворення автоспор. Види *Chlamydomonas* за несприятливих умов можуть тимчасово переходити в пальмелевидний стан, при цьому внаслідок гідратації матриксу їх клітинні стінки ослизнюються і злипаються, що призводить до утворення великих скупчень клітин.

У деяких випадках відбувається також ослизнення клітинних стінок *Botryococcus* Kütz. У такому випадку залишки оболонки материнської клітини ослизнюються в центрі колонії, проте чітко помітні на її периферії, або з них формуються слизові прямі чи розгалужені сполучні тяжі.

1.2. Поширення мікроводоростей у природі

Синьозелені водорості як одна зі стародавніх груп мікроскопічних організмів довгий період зазнавали впливу різноманітних зовнішніх умов та поступово пристосовувалися до них. Вони зберегли риси примітивної організації і здобули велику функціональну лабільність до різних умов існування, що відобразилося на специфіці їхньої біохімічної організації. У багатьох з них сформувалася спроможність адаптуватися до екстремальних умов існування. Цим пояснюється факт їх виняткової пристосованості та повсюдного поширення в природі.

Вони відіграють суттєву роль у житті природних екосистем, у кругообігу речовин у природі. За їх рахунок здійснюється майже весь об'єм фотосинтезу в морській воді і значна його частина в прісноводних водоймах (Биохимия синезеленых водорослей, 1978; Водоросли. Справочник, 1989; Андреюк и др., 1990; *Algae of Ukraine...*, 2006).

Особливості метаболізму синьозелених водоростей, висока стійкість до різких коливань вологості і температури, нестачі та надлишку світла, засолення, тощо обумовлюють їх широке розповсюдження в різних екологічних нішах у багатьох регіонах.

Мікрowodорості розповсюджені в різноманітних кліматичних зонах, зберігаючи свою життєздатність як в умовах тропіків, гейзерів, так і зонах крайньої мерзлоти, зокрема в Антарктиді, де окремі з них розвиваються на снігових покриттях та льодовиках. Завдяки особливому колоїдному стану протоплазми синьозелені водорості можуть поселятися в гарячих джерелах.

Водне середовище для них є сприятливим і природним місцезнаходженням. Водорості розвиваються в прісноводних і морських водоймах, рівномірно розподіляючись у товщі води, концентруючись біля або на її поверхні, що найбільш характерно для ставків або слабопроточних ділянок рік і озер.

Найчастіше синьозелені водорості зустрічаються в прісній воді ставків і калюж, інколи у великій кількості, забарвлюючи воду і створюючи неприємний запах.

У спекотний період літа внаслідок забруднення внутрішніх водойм стоками з удобрених полів, зарегулювання стоку річок у водосховищах підвищується рівень азоту й фосфору, значно зростає їх евтрофікація. Саме за таких обставин створюються умови для масового розвитку мікроскопічних водоростей, головним чином певних видів синьозелених і зелених, що призводить до виникнення явища “цвітіння” води – проблеми, яка є причиною погіршення її якості. Розвитку синьозелених водоростей сприяє збільшення температури й сонячної радіації, тому у водосховищах південних широт вони розвиваються інтенсивніше, ніж у північних. За певних умов синьозелені водорості, які розвиваються в планктоні південних евтрофних водойм, багатих на поживні речовини, викликають “цвітіння” води, наприклад у Червоному морі. Збудником “цвітіння” стає *Trichodesmium erythraeum*, у біомасі якого в процесі його масового розвитку накопичується надлишок фікоеритрину – червоного пігменту фікобілінової природи. Завдяки цьому створюється враження червоного забарвлення води, від чого свою назву отримало Червоне море.

Окремі види синьозелених водоростей мають здатність до швидкого переходу від активного функціонування до стану спокою і навпаки. Протягом довгого часу, навіть десятиліття вони можуть зберігати життєдіяльність у висушеному стані та за умов появи вологи відразу ж переходити до активної діяльності.

Синьозелені водорості, широко розповсюджені в ґрунтових біоценозах, є невід'ємним компонентом ґрунтових екосистем, складовою частиною ґрунтової мікрофлори. Вони тісно пов'язані з усіма компонентами цих систем, з ґрунтом та з вищими рослинами. Неабияку роль у цьому відіграють азотфіксуючі синьозелені водорості, оскільки з ними пов'язано підвищення родючості ґрунтів.

Переважаання *Cyanophyta* вважається однією з особливостей угруповань водоростей, які формуються в процесі степового ґрунтоутворення. Позитивним моментом підвищення родючості ґрунтів є їх альгалізація, яка здійснюється шляхом внесення в ґрунт живих культур водоростей перед або під час посівів. Цей метод практичного використання водоростей найбільш ефективний в умовах зрошувального землеробства. Крім того, окремі види водоростей можуть слугувати індикаторами стану ґрунтів, ступеня їх зволоженості, рівня рН, тощо. Вони беруть участь у багатьох біохімічних процесах, у накопиченні органічних речовин і азоту, руйнуванні мінеральних субстратів. На поверхні ґрунтів вони утворюють різного виду розростання, проникають у глибину ґрунту. Вважається, що синьозелені водорості є першими гумусоутворювачами.

Основними еколого-географічними факторами, які визначають розповсюдження синьозелених водоростей у цілих ґрунтах, є температура, вологість, освітленість. Оптимальна вологість для розвитку більшості водоростей знаходиться в межах 60-80 % повної вологості. Розвиток синьозелених водоростей на поверхні ґрунтів вказує на їх здатність витримувати надзвичайно високу освітленість та зміни її інтенсивності. Значний вплив має рівень рН, сольовий склад ґрунтів і наземна рослинність.

Цілий ряд мікроскопічних водоростей росте на суші, утворюючи плівки зеленого або синьо-зеленого кольору не тільки на поверхні ґрунту і в самій його товщі, але й на інших субстратах (на камінні, поверхні скель або на корі дерев). Деякі з них розвиваються всередині вапнякового субстрату. Вони знаходяться в порівняно сухих місцях, за відсутності води, здебільшого в стані спокою. Ці об'єкти еволюціонували в напрямку створення механізмів утримання водного ресурсу. Необхідну для своєї життєдіяльності воду вони поповнюють з атмосферної та ґрунтової вологи. Завдяки цьому такі водорості здатні тривалий час витримувати періоди дефіциту вологи і не втрачати життєдіяльності. Прикладом може служити стійкість штамів роду *Nostoc* до висушування, що забезпечується протекторною та вологопоглинаючою роллю позаклітинних слизоподібних полісахаридів. Останні служать резервуаром для води і тим самим створюють умови, які запобігають довготривалому висушуванню. Таким чином досягається забезпечення певного рівня вологи для водоростей, які розвиваються в заглибинах на поверхні кам'яних брил у пустелях Ізраїлю, де протягом багатьох місяців вода з'являється лише у вигляді ранкової роси.

Окремі види водоростей розвиваються в екстремальних умовах. Їх знаходять у засолених водоймах, термальних джерелах. Ценози водоростей солоних водойм, так званий гідрогалофітон, представлений багатьма видами, серед яких мало загальних форм, характерних для морських і прісноводних таксонів.

На лідируючі позиції в біоценозах у деяких випадках виходять зелені водорості, які розвиваються масово. Так, мікроскопічні зелені водорості нерідко викликають зелене або червоне “цвітіння” води, ропи (*Dunaliella salina*), кори дерев, стін будівель, що в деяких випадках супроводжується утворенням сапропелів, рідких і твердих нафтоподібних сполук, наприклад при масовому розвитку *Botryococcus braunii*.

Окремі види синьозелених водоростей розвиваються в гарячих джерелах, що пов'язано з їх термофільністю, здатністю виживати і розвиватись за умов високих температур. Вони успішно розвиваються при підвищенні температури до 75-80 °С (гідротермофітон). У той же час окремі види синьозелених водоростей проявляють надзвичайну стійкість до змін температури, витримуючи охолодження до -80 °С. При цьому вони не втрачають своєї життєдіяльності в суворих умовах вічного холоду і після їх перенесення в сприятливі для росту умови відновлюють процеси росту.

Здатність деяких синьозелених водоростей фіксувати азот (*Anabaena*, *Gloeocapsa*, *Nostoc*, *Calothrix*) дозволяє їм поселятися в місцях, де повністю відсутні поживні речовини, наприклад на вулканах після їх виверження.

Завдяки фототрофності та повсюдному розповсюдженню синьозелені водорості є першими поселенцями на чисто мінеральних субстратах. На такі техногенні, позбавлені життя субстрати синьозелені водорості заносяться з пилом оточуючих ґрунтів і розмножуються в період зволоження. Їх наступна життєдіяльність призводить до накопичення органічних речовин для розвитку гетеротрофної мікрофлори.

Деякі синьозелені водорості (*Gloeocapsa*, *Nostoc*, *Scytonema*, *Stigonema*, *Rivularia*, *Calothrix*) входять до складу лишайників.

1.3. Мікрowodорості як потенційне джерело унікальних біохімічних сполук

Розширення сфери практичної діяльності людей, пошуки нових джерел цінних речовин спонукало до використання з цією метою біомаси мікроскопічних водоростей. Усебічні дослідження цих організмів відкрили широкі можливості їх використання в різних галузях діяльності людини. Знання умов їх розвитку та ступеня поширення у водоймах і на відповідних субстратах, з'ясування особливостей метаболізму за різних умов природного середовища та культивування дозволяють вважати, що водоростям належить значна роль у

вирішенні проблем охорони навколишнього середовища, стану екології, продовольчих питань, медицини, зокрема фармакології, тощо.

Водорості надзвичайно численні, вони є важливим джерелом різноманітних харчових продуктів (Henrikson, 1989; Becker, 2004; Spolaore et al., 2006). Людина мало використовує їх безпосередньо як харчовий компонент, проте значне місце в її раціоні займає риба та інші морепродукти, які в свою чергу в їжу використовують водорості. Одним з найпоширеніших способів використання водоростей як можливих носіїв цілого спектра унікальних сполук є застосування їх біомаси, отриманої шляхом масового культивування. Це дає можливість значною мірою вирішувати проблему одержання необхідної кількості водоростей з метою всебічного біохімічного їх дослідження, вивчення різних сторін метаболізму та виявлення ряду біологічно цінних та специфічних сполук.

Мікрowodорості широко досліджуються з метою з'ясування можливості їх застосування як додаткового джерела білка та окремих амінокислот, ряду вітамінів, компонентів пігментного комплексу, зокрема фікобілінових пігментів, тощо. У наш час водорості розглядаються як перспективні біосистеми, здатні до ефективного перетворення енергії світла в хімічну енергію водню – альтернативного та екологічно чистого палива. Виробництво біопалива як екологічно безпечної технології вважається одним з першочергових завдань переходу до сучасної енергетики, що ґрунтується на використанні поновлюваних енергетичних ресурсів. Мікрowodорості можуть використовуватись у вирішенні глобальної енергетичної проблеми людства як сировина для виготовлення біодизельного палива.

Спрямоване культивування водоростей може забезпечити синтез цілого ряду біохімічних компонентів. Цей процес базується на використанні каталітичного потенціалу компонентів клітин, клітинних стінок та екзометаболітів різних таксономічних груп водоростей. Це дозволяє отримувати унікальні сполуки, які можуть використовуватись у певних сферах діяльності людини. У наш час лідерами в розробці та освоєнні досягнень у цій галузі є США, Японія, країни Західної Європи, Росія, які мають багаторічний досвід отримання та використання біомаси водоростей та її індивідуальних біополімерів у харчовій промисловості, сільському господарстві, фармакології, тощо. Ці країни володіють потужним потенціалом нової техніки, постійно здійснюють фундаментальні та прикладні дослідження в галузі фізіології, біохімії водоростей та їх культивування з метою отримання біомаси, збагаченої на певні компоненти. Досягнення переваг у цій галузі є одним із центральних завдань в економічній політиці розвинених країн. В останні десятиріччя є певні досягнення і в Україні. Здійснюється масштабне культивування окремих видів мікрowodоростей, головним чином *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina* та деяких інших. Проте

лабораторне та масове вирощування, біохімічні дослідження цілого ряду інших мікроводоростей здійснюється вкрай мало. Однією з причин цього стану є недостатня інформованість про наукові основи процесу дотримання необхідних у кожному окремому випадку умов культивування мікроводоростей, що може забезпечити отримання біомаси необхідного складу.

Незважаючи на досить високу енергоємність закритого способу культивування водоростей з використанням штучного освітлення, що негативно позначається на собівартості отриманої біомаси, цей спосіб дозволяє в контрольованих умовах отримувати водорості, збагачені на певні елементи.

2. КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРОВОДОРОСТЕЙ

Культивування мікроводоростей – порівняно нова галузь біотехнології. Перші спроби штучного культивування альгологічно чистої одноклітинної зеленої водорості *Chlorella vulgaris* були зроблені М. Беєрінком (Beijerinck) у 1890 р. Пізніше О. Варбург почав дослідження процесу фотосинтезу в цієї мікроводорості, для чого на початку ХХ століття налагодив її лабораторне культивування.

Зацікавленість промисловим культивуванням виникла на півстоліття пізніше і до сьогодення зростає в зв'язку зі спробами використати мікроводорості як ефективні газообмінники, джерело багатьох корисних речовин. На основі досліджень, проведених у Стенфорді (США), Ессені (Німеччина) і Токію після 1948 року, були розроблені принципи масового культивування мікроводоростей, підсумовані в класичній роботі (Algal culture..., 1953).

Культивування *Chlorella* в промислових масштабах почалось у 1960-х роках в Японії, а пізніше, на початку 1970-х, компанія Sosa Texcoco S.A. організувала виробництво іншої мікроводорості – *Spirulina* – в Мексиці. У 1977 р. Компанія Dai Nippon Ink и Chemicals Inc. створили завод по виробництву *Spirulina* в Таїланді, а всього до 1980 р. в Азії було побудовано 46 великих фабрик, що виробляли близько 1000 кг мікроводоростей (головним чином *Chlorella*) за місяць. Вже в 1996 році тільки одна Японія поставляла на світовий ринок близько 2000 т хлорели. Інші потужності по культивуванню *Spirulina* були розгорнуті в США (наприклад, Microbio в Каліфорнії і Cyanotech на Гавайях).

Комерційне виробництво зеленої одноклітинної водорості *Dunaliella salina* як джерела β-каротину стало третім головним напрямком промислового використання мікроводоростей після відкриття в 1986 р. фірмою Western and Betatene Ltd (сучасна назва – Cognis Nutrition & Health) заводу в Австралії. Незабаром до них додалися заводи в Ізраїлі і США. Приблизно в той же самий час в Індії було розгорнуто крупномасштабне виробництво синьозелених водоростей. Дещо пізніше кілька заводів, продукуючих *Haematococcus pluvialis* як джерело астаксантину, були відкриті в США та Індії. Таким чином, за досить короткий час, близько 30 років, промисловість мікроводоростевої біотехнології значно зросла.

2.1. Характеристика розвитку мікроводоростей в умовах культури

Ріст мікроводоростей зазвичай визначають за збільшенням їх біомаси або зростанням числа клітин. При цьому слід відзначити, що зростання біомаси не обов'язково пов'язане зі збільшенням числа клітин, але і з їх розмірами (Стейниер и др., 1979; Шлегель, 1987). У

процесі росту популяції мікрободоростей клітини розмножуються (діляться), тобто їх число зростає.

За способом штучного культивування мікрободоростей прийнято розрізняти поняття “відкритої” і “закритої” систем. З самих назв зрозуміло, що відкритою є система в яку як надходять компоненти, так і вилучаються з неї. Якщо при культивуванні відбувається постійне додавання поживних речовин, а також видалення біомаси і продуктів обміну, система є відкритою, а культура називається *неперервною*. Ріст мікроорганізмів у хемостаті і турбідостаті є прикладом неперервного культивування

Культуру мікрободоростей / мікроорганізмів називають *періодичною*, або *накопичувальною*, якщо після початку її росту не додаються поживні речовини і не видаляється біомаса або кінцеві продукти обміну. Періодична культура, що містить обмежену початкову кількість поживних компонентів, є закритою системою. Гомогенну періодичну культуру, яка добре перемішується і в середовищі відсутні градієнти концентрацій, називають *простою гомогенною періодичною культурою* (Перт, 1978; Шлегель, 1987).

До найбільш уживаних і інформативних кількісних характеристик росту періодичної культури відносяться: питома швидкість росту “ μ ”, час подвоєння біомаси “ t_d ”, константа швидкості ділення “ r ”, час генерації “ g ”, тривалість лаг-фази, економічний коефіцієнт, максимум біомаси (вихід біомаси).

Швидкість росту популяцій мікроорганізмів. Швидкість росту мікрободоростей / мікроорганізмів оцінюють за змінами концентрації клітин (числа клітин в одиниці об’єму суспензії) або густини мікроорганізмів (сухої маси мікроорганізмів в одиниці об’єму суспензії). Зрозуміло, що густина суспензії мікрободоростей пропорційна числу клітин, однак ця залежність змінюється в процесі росту, що особливо характерно для періодичної культури. Мікрободорості, як і інші мікроорганізми, розмножуються переважно простим поділом навпіл, і в період інтенсивного росту культура містить багато молодих клітин, маса яких відрізняється від маси зрілих клітин. Тобто співвідношення між числом і масою змінюється в процесі росту періодичної культури (Стейниер и др., 1979).

Для визначення числа клітин, або маси мікрободоростей в одиниці об’єму (густина клітин), потрібно використовувати гомогенну суспензію мікроорганізмів. Оскільки багато мікрободоростей утворюють ланцюжки, розгалужені нитки, колонії і т. п., дуже важко отримати гомогенну суспензію клітин, що утруднює, а часом і унеможлиблює підрахунок числа клітин. Більш зручною процедурою визначення швидкості росту культур мікрободоростей є контроль густини суспензії. У цьому випадку при вивченні швидкості

росту мікробіодоростей у періодичній культурі окремі клітини не беруться до уваги, і популяція розглядається як автокаталітична система в процесі розвитку.

Одним з основних параметрів, що характеризує ріст культури, є *питома швидкість росту* μ

$$\mu = \frac{\Delta X}{X \Delta t} \quad (2.1),$$

де X – густина культури [маса/об'єм], μ – питома швидкість росту, коефіцієнт питомого приросту, або просто питомий приріст густини [час⁻¹] (Иерусалимский, 1966; Непрерывное..., 1968; Ждан-Пушкина, 1983).

Як видно з визначення, питома швидкість росту μ характеризує відносний приріст густини мікроорганізмів за одиницю часу. Коли μ протягом певного часу залишається незмінним, то такий ріст називають *експоненційним*, а відповідний проміжок часу – експоненційною (логарифмічною) фазою росту. Після інтегрування рівняння (1)

$$\begin{aligned} dX/dt &= \mu X \\ \int dX/X &= \int \mu t \end{aligned}$$

отримуємо

$$\ln X = \mu t + \ln C \quad (2.2),$$

де $\ln C$ – константа інтегрування.

Постійну інтегрування можна визначити за умови, що в початковий момент часу $t=0$ маємо певну вихідну густину клітин X_0 .

$$\ln X_0 = \ln C$$

$$\ln X = \mu t + \ln X_0 \quad (2.3)$$

$$X_t = X_0 \exp(\mu t) \quad (2.4)$$

Оскільки при експоненційному рості мікроорганізмів (2.4) існує лінійна залежність між часом та логарифмом густини суспензії клітин (2.3), то такий ріст називають також *логарифмічним*. Рівняння (2.4) вперше було отримане Томасом Робертом Мальтусом на рубежі XVIII – XIX століть і наведено в роботі “Нарис про закон народонаселення в зв'язку з майбутнім удосконаленням суспільства”. Виходячи з цього рівняння, Мальтус зробив висновок, що популяції здатні до необмеженого експоненційного росту. Тому досить часто експоненційний ріст називають мальтузіанським. Закон постійного експоненційного росту виконується для популяції мікроорганізмів, якщо умови оточення і склад біомаси залишаються постійними. Присутність експоненційної фази росту добре відома для багатьох культур як прокаріотів так і еукаріотів при дотриманні сприятливих умов. У періодичній

культури експоненційний ріст раніше або пізніше припиняється через обмеженість живильного ресурсу.

Жак Моно в 40-х роках (Monod, 1949) запропонував залежність між питомою швидкістю росту і концентрацією субстрату, який лімітує ріст мікроорганізмів:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_s}, \quad (2.5)$$

де $\mu_{\max}$ – максимальна питома швидкість росту, S – концентрація субстрату, K_s – константа насичення, чисельно дорівнює концентрації субстрату, при якій питома швидкість росту складає половину максимальної ($\mu = \frac{1}{2}\mu_{\max}$) (Иерусалимский, 1966; Ждан-Пушкина, 1983). Зі збільшенням концентрації субстрату S питома швидкість росту μ асимптотично наближається до $\mu_{\max}$. Характер залежності μ від S наведений на рис. 2.1.

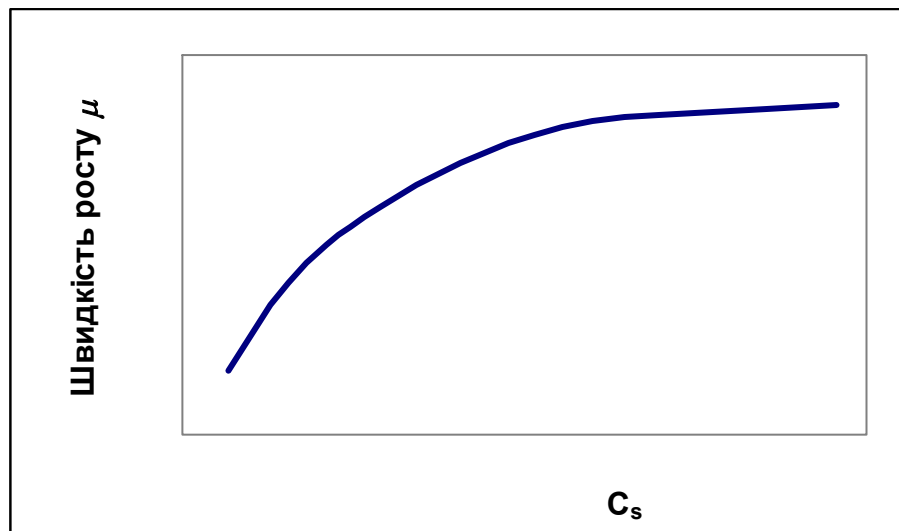


Рис. 2.1. Залежність питомої швидкості росту μ мікробудових від концентрації субстрату S , який лімітує ріст.

Рівняння Моно аналогічне рівнянню Міхаеліса-Ментен для ферментативних реакцій, яке пов'язує швидкість ферментативної реакції з концентрацією субстрату. Різниця полягає в тому, що в моделі ферментативної реакції Міхаеліса-Ментен реакція протікає за постійної концентрації ферменту, тоді як процеси росту супроводжуються збільшенням біомаси та кількості ферментів. Тому в рівнянні Моно абсолютна швидкість замінена на питому швидкість росту. Константа насичення K_s показує, наскільки повно мікроорганізми можуть використовувати субстрат. Значення K_s для багатьох субстратів (джерела вуглецю, іонів) становить близько 10^{-5} М, а для амінокислот і факторів росту воно є на порядок нижчим.

Для характеристики росту культур мікроорганізмів використовують також *абсолютну швидкість* росту k :

$$k = \Delta X / \Delta t, \quad (2.6)$$

де X – густина культури (маса/об'єм), k – коефіцієнт росту, або абсолютний приріст густини за одиницю часу. Абсолютна швидкість росту, або просто швидкість росту k , характеризує приріст густини мікроорганізмів за одиницю часу (маса/ об'єм·час).

Час подвоєння біомаси. Важливим параметром, який характеризує ріст мікроорганізмів, є час подвоєння біомаси (густини суспензії) популяції мікробіодоростей. Легко отримати зв'язок між питомою швидкістю росту μ і часом подвоєння t_d біомаси. Розглянемо випадок, коли сама питома швидкість росту μ постійна, так званий експоненційний або логарифмічний ріст культури. Дійсно, з рівняння (2.4) видно, що за час який дорівнює часу подвоєння (t_d), початкова густина клітин X_0 збільшується до $2X_0$:

$$2X_0 = X_0 \exp(\mu t_d).$$

Звідси визначаємо час подвоєння маси клітин – t_d :

$$\begin{aligned} 2 &= \exp(\mu t_d), & \ln 2 &= \mu t_d \\ t_d &= \ln 2 / \mu & \ln 2 &= 0,693 \\ t_d &= 0,693 / \mu \end{aligned} \quad (2.7)$$

Для ілюстрації подвоєння біомаси культури підставимо значення t_d у рівняння (2.4):

$$X_t = X_0 \exp(\mu t).$$

При $t_1 = 1t_d = \ln 2 / \mu$

$$\begin{aligned} X_{t_1} &= X_0 \exp[\mu (\ln 2 / \mu)] \\ X_{t_1} &= X_0 \exp[\ln 2] \\ X_{t_1} &= 2 X_0. \end{aligned}$$

При $t_n = nt_d = n (\ln 2 / \mu)$

$$\begin{aligned} X_t &= X_0 \exp[\mu n (\ln 2 / \mu)] \\ \exp[n (\ln 2)] &= \exp[(\ln 2^n)] = 2^n \\ X_{t_n} &= 2^n \cdot X_0. \end{aligned} \quad (2.8)$$

Таким чином, за проміжки часу, які кратні часу подвоєння біомаси, зростання густини суспензії мікробіодоростей відбувається в геометричній прогресії: X_0 ; $2X_0$; 2^2X_0 ; 2^3X_0 ; ...; 2^nX_0 .

Час подвоєння важко визначити точно експериментальним шляхом. Для визначення часу подвоєння знаходять збільшення маси клітин за певний проміжок часу і розраховують час подвоєння густини клітин, тобто час генерації.

Число поділів клітин, час генерації. Якщо протягом певного часу (t) відбулося n -кратне подвоєння густини клітин (рівняння 2.8), то вираз

$$g = t/n \quad (2.9)$$

визначає *середній час генерації*, або час подвоєння густини клітин. Звичайно, при визначенні часу генерації більш природно оперувати не густиною клітин водоростей, а кількістю клітин в одиниці об'єму, концентрацією клітин. Якщо спочатку в одиниці об'єму суспензії водоростей знаходилося N_0 клітин, то через певний проміжок часу t після " n " поділів число клітин стане $N_n = N_0 2^n$. Виходячи з цього, легко знайти число поділів клітин. Після логарифмування цей вираз перетворюється так:

$$\ln N(t) = \ln N_0(t_0) + n \ln 2. \quad (2.10)$$

Звідси число поділів клітин n дорівнює:

$$n = (\ln N(t) - \ln N_0(t_0)) / \ln 2.$$

Відповідно час, необхідний для одного циклу ділення, або час генерації,

$$g = t/n = \ln 2 / [(\ln N(t) - \ln N_0(t_0)) / t]. \quad (2.11)$$

З рівняння (2.3) видно, що

$$\mu = (\ln N_t - \ln N_0) / t. \quad (2.12)$$

Порівнюючи рівняння (2.11) і (2.12), бачимо, що в знаменнику виразу (2.11) знаходиться питома швидкість збільшення числа клітин в одиниці об'єму суспензії водоростей, а середній час генерації становить:

$$g = \ln 2 / \mu = 0,693 / \mu. \quad (2.13)$$

У випадку, коли збільшення клітинної маси строго пропорційне збільшенню числа клітин, $t_d = g$.

Для прикладу визначимо число поділів клітин " n " і час генерації " g ". Якщо за 15 годин відбулося збільшення концентрації клітин від 10^3 до 10^5 , знаходимо

$$n = (\ln 10^5 - \ln 10^3) / 0,693 = 6,65$$

$$g = t/n = 15/6,64 = 2,26 \text{ годин.}$$

Час подвоєння клітин / біомаси суттєво залежить від оптимізації параметрів культивування (світло, перемішування, збалансованість живильного середовища, CO_2 , і т.п.). Так, час подвоєння біомаси для *Chlorella*, за даними різних авторів, знаходиться в межах 10-30 годин. Час подвоєння кількості клітин бактерій суттєво менший і становить 1-2 години. Коли йде мова про "час подвоєння" числа клітин, то мається на увазі середній час, протягом якого відбувається подвоєння числа клітин у культурі загалом. Цей час не дорівнює часу генерації окремих клітин, який значно відрізняється через нееквівалентність клітин у культурі.

Таким чином, найбільш інформативними параметрами, які характеризують ріст мікроводоростей, є питома швидкість росту " μ ", час подвоєння густини " t_d ", а коли відслідковують концентрацію клітин, то час генерації " g ".

2.2. Ріст мікродоростей у періодичній культурі

Необмежений у часі експоненційний ріст культури мікродоростей можливий лише у випадку постійного додавання всіх необхідних для росту компонентів (поживні речовини, аерація, світло, тощо) та видалення продуктів життєдіяльності. За умов періодичного культивування живильне середовище містить обмежену початкову кількість поживних речовин (субстратів), і мікродорості ростуть, як правило, доки вміст якогось необхідного їм компонента не досягне критичної величини, після чого ріст сповільнюється і в подальшому призупиняється. Ріст у такій закритій системі підкоряється закономірностям, яким підлягають не тільки одноклітинні, але й багатоклітинні організми. Періодична культура поводить себе як багатоклітинний організм з генетично обмеженим ростом. Якщо спостерігати за ростом періодичної гомогенної культури, тобто культури в рідкому середовищі, яке добре перемішується, то виявляється, що швидкість росту змінюється в часі. Крива, яка описує залежність логарифма числа клітин, числа живих клітин, або густини біомаси мікродоростей від часу для періодичної культури, називається *кривою росту* (Перт, 1978; Стейніер і др., 1979; Шлегель, 1987). Для простої гомогенної періодичної культури типова крива росту має так звану S-подібну форму і дозволяє виділити чотири фази росту, які проходять у певній послідовності і які виражені більшою або меншою мірою: початкову, або лаг-фазу, фазу логарифмічного росту, лінійну фазу, стаціонарну фазу, фазу відмирання культури (рис. 2.2).

Іноді виділяють ще додатково три фази росту культури, як перехідні: від початкової до експоненційної, від експоненційної до лінійної, та від стаціонарної до фази відмирання.

Лаг-фаза (початкова фаза). Назва “лаг” походить від англійського слова lag – відставання, затримка. Ця фаза охоплює проміжок часу між інокуляцією (засівом культури в живильне середовище) та досягненням максимальної швидкості поділу клітин. Тривалість цієї фази залежить, головним чином, від попередніх умов культивування, віку інокуляту, концентрації клітин в інокуляті, а також від ступеня оптимальності середовища для росту даної культури. Наприклад, якщо інокулят узятий зі старої культури (в стаціонарній фазі росту), то клітинам потрібно спочатку адаптуватися до нових умов шляхом синтезу РНК, ферментів, формуванням рибосом. Треба відмітити, що у випадку використання великої кількості клітин в інокуляті тривалість лаг-фази скорочується і вона може взагалі не спостерігатися.

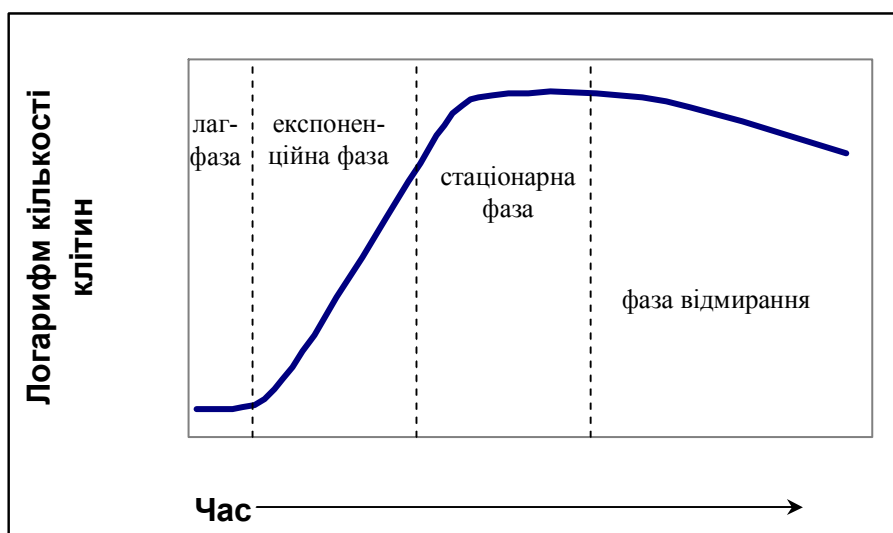


Рис. 2.2. Крива росту мікрободоростей у періодичній культурі.

Експоненційна фаза. Ця фаза починається після того, як клітини адаптуються до даних умов і ріст культури не обмежується нестачею поживних речовин або надлишком продуктів обміну. Експоненційна (або логарифмічна) фаза росту характеризується постійною максимальною питомою швидкістю росту концентрації клітин культури, можливою за даних умов, а час подвоєння біомаси t_d і час генерації g рівні і максимальні. Експоненційний ріст описується рівнянням

$$X_t = X_0 \exp(\mu_{\max} t)$$

Величина питомої швидкості під час експоненційної фази залежить від виду водоростей та збалансованості середовища. Розмір клітин і вміст білка в багатьох водоростей у цій фазі залишаються постійними, тому іноді кажуть, що культура мікрободоростей у цьому випадку складається зі “стандартних клітин”. Якщо точно встановлено, що число клітин, вміст у них білка та суха маса збільшуються з однаковою швидкістю, то за ростом культури можна слідкувати, користуючись одним із цих показників. Нерідко, однак, буває, що в експоненційній фазі росту клітини періодичної культури змінюються, оскільки поступово змінюється середовище: зменшується концентрація субстрату, збільшується густина клітинної суспензії та накопичуються продукти обміну життєдіяльності. У зв’язку з тим, що в експоненційній фазі швидкість поділу клітин відносно постійна, ця фаза найбільш зручна для визначення швидкості поділу (швидкості росту). Вивчення впливу факторів середовища (рН, температури, аерації і т.п.) та порівняння різних середовищ проводять, слідкуючи за характером росту під час експоненційної фази.

Лінійна фаза. Після фази експоненційного росту настає період лінійного росту, в якому (абсолютна) швидкість приросту біомаси (числа клітин) постійна.

$$\Delta X / \Delta t = k \quad (2.14)$$

$$X_t = kt \quad (2.15)$$

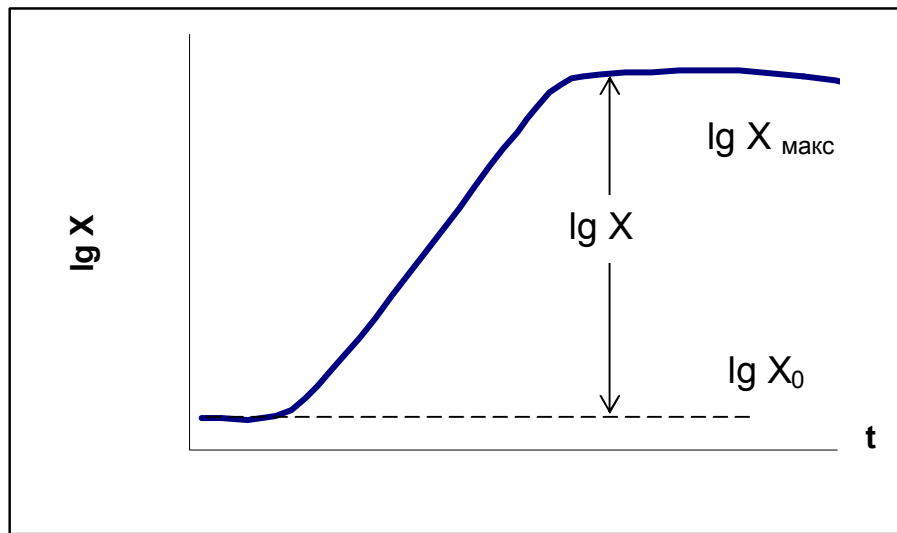
Лінійною функцією часу t є густина біомаси (концентрація клітин), а не питомий приріст біомаси або числа клітин ($dX/X \cdot dt = \mu$), як це є в логарифмічній фазі. У деяких випадках лінійний ріст може спостерігатися безпосередньо після лаг-періоду, а ріст клітин з експоненційною швидкістю відсутній зовсім. Така ситуація спостерігається, коли в клітинах у силу різних причин (інгібування продуктом, затемнення водоростей і т.п.) сповільнюється швидкість біосинтетичних процесів.

Стаціонарна фаза. Вона настає тоді, коли густина суспензії (число клітин) перестає збільшуватись. Швидкість росту залежить від концентрації основних мінеральних компонентів: при зменшенні їх концентрації ще до повного їх використання вона починає сповільнюватись. Тому перехід від експоненційної фази до стаціонарної відбувається поступово; саме з-за цього його дуже часто виділяють в окрему фазу – лінійну. Швидкість росту може знижуватись не тільки через нестачу основних мінеральних компонентів, але й через високу щільність суспензії (як наслідок погіршення освітленості в об'ємі або накопичення токсичних продуктів обміну). Загальна картина залежить від фактора, який найбільше лімітує ріст. Швидко гинуть дуже чутливі клітини, інші довго зберігають життєдіяльність. Кількість біомаси, яка продукується в стаціонарній фазі, називають виходом або врожаєм. Цілком зрозуміло, що врожай залежить від багатьох факторів, у тому числі від сезону.

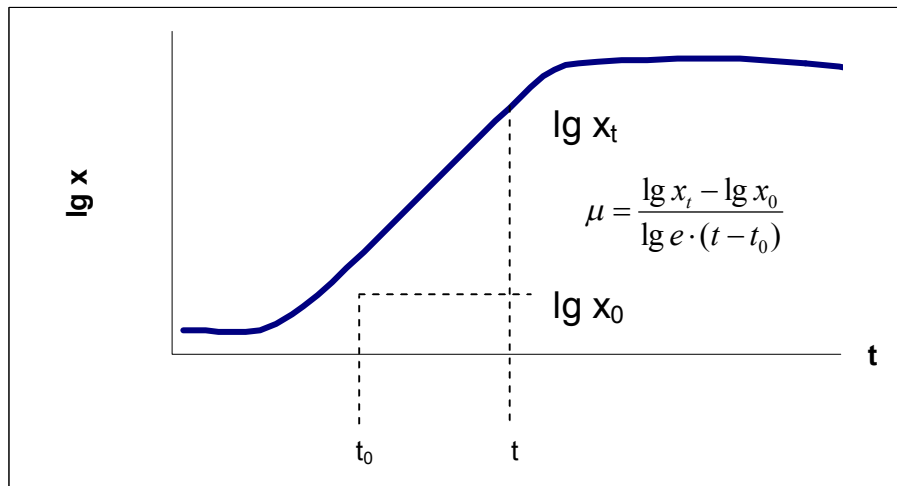
Фаза відмирання. Практично будь-який з факторів, від яких залежить швидкість росту культури (вичерпання поживних речовин, накопичення токсичних продуктів і т.п.), може стати лімітуючим і дати поштовх до переходу у фазу відмирання. Цілком зрозуміло, що комбінація кількох лімітуючих факторів прискорює цей процес. Саме в зв'язку з цим фаза відмирання і причина загибелі клітин вивчені недостатньо.

Параметри кривої росту. Найбільший інтерес викликають у першу чергу три параметри росту: врожай, швидкість росту та тривалість лаг-фази.

Врожай. Врожай прийнято визначати як різницю між максимальною та вихідною біомасою мікроводоростей $X = X_{\max} - X$ (рис. 2.3, А). Цю величину виражають у грамах сухої маси. Найчастіше його відносять до одиниці об'єму, одиниці освітлюваної площі або площі культиватора, а іноді і до одиниці часу – [суха маса] / [л] або [суха маса] / [л доба].



А



Б

Рис. 2.3. Параметри росту: врожай клітин (А), швидкість росту (Б).

Економічний коефіцієнт. Особливо важливе значення має відношення врожаю клітин водоростей до кількості використаного мінерального середовища (S). Якщо ці дві величини виражені у вагових одиницях, відношення X/S називають *економічним коефіцієнтом* і позначають $Y = X/S$ (Перт, 1978).

Швидкість експоненційного росту – міра швидкості росту в експоненційній фазі. Її знаходять з певної початкової густини мікроводоростей X_0 у момент часу t_0 та “кінцевої” густини водоростей X_t у момент часу t (рис. 2.3, Б). Дійсно, при експоненційному рості

$$X_t = X_0 \exp(\mu t)$$

$$\ln X_t = \ln X_0 + (\mu t)$$

константа швидкості експоненційного росту (питома швидкість росту) буде дорівнювати

$$\mu = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{t - t_0} = \frac{\lg X_t - \lg X_0}{\lg e \cdot (t - t_0)} \quad (2.16)$$

Експоненційна стадія росту, як правило, коротка (постійне максимальне значення μ).

Лінійна стадія. Для водоростей більш тривалою є лінійна стадія росту з постійною абсолютною швидкістю росту k .

$$dX/dt = k$$

Порівняємо це з питомою швидкістю росту

$$\frac{dX}{Xdt} = \mu \quad \frac{dX}{dt} = k = \mu X \quad (2.17)$$

$$dX/Xdt = \mu$$

Таким чином, постійна швидкість росту k при зменшенні μ компенсується зростанням біомаси (числа клітин) X культури, тобто $\mu X = k = \text{const}$. З виразу (2.17) видно, що найбільш вигідною є культура (поєднання штаму і режиму культивування), в якій вдається зберегти максимальне значення питомого приросту μ при найбільш високій густині суспензії X . Чим більше X , при якому зберігається високе значення μ , тим більш ефективним з точки зору фотосинтетичної продуктивності й абсолютних приростів біомаси буде процес культивування. Таку культуру називають *інтенсивною*. Культуру, в якій максимальне значення $k = \mu X$ (абсолютний приріст) досягається за рахунок високих значень X , а μ значно відрізняється від максимального μ_{max} для даного штаму, називають *екстенсивною*. З практичної точки зору оптимальна густина для культивування (при збереженні μX_{max}) вибирається в перехідному режимі між інтенсивним і екстенсивним культивуванням.

Тривалість лаг-фази. Цей параметр є важливим для висновків про стан водоростей або придатність середовища. Його визначають як проміжок часу між моментом t_r , в якому культура досягла певного значення X_r , і моментом t_i , в який вона могла б досягти такої ж густини, якщо б відразу після інокуляції почався би експоненційний ріст (індекс “r” позначає лаг-фазу, індекс “r” – реальний ріст, а індекс “i” – ідеальний)

$$T_l = X_0 - t_i = t_r - (\ln X_r - \ln X_0)/\mu. \quad (2.18)$$

Оскільки параметр T_l придатний лише для порівняння двох культур з однаковими швидкостями експоненційного росту, рекомендують вимірювати тривалість лаг-фази не в абсолютних, а у фізіологічних одиницях (часу генерації g). Різниця між ростом, що спостерігається, і розрахованим ідеальним виражена числом, яке кратно часу генерації і дорівнює $L = T_l X$. Таким чином, величина L показує, на скільки подвоєнь (генерацій) реальна культура відстає від ідеальної, яка з самого початку росла б експоненційно. Цю величину, як

правило, і використовують при порівнянні даних, які характеризують вплив різних живильних середовищ (чи їх компонентів), інгібіторів росту, тощо.

2.3. Ріст мікроводоростей у неперервній культурі

У періодичній наростаючій культурі умови весь час змінюються: густина популяції зростає, а концентрація поживних речовин зменшується. У багатьох випадках є доцільним і навіть бажаним, щоб клітини довго перебували у фазі експоненційного росту за постійної концентрації мінеральних компонентів та незмінних інших параметрах культивування. Найпростіше можна наблизитись до таких умов, просто багаторазово і порівняно часто переносячи клітини на нове живильне середовище. Найкраще такої мети можна досягти, якщо в ємність, в якій розвивається популяція мікроводоростей, що ростуть, безперервно вводити новий живильний розчин та одночасно видаляти з нього певну кількість суспензії водоростей (Непрерывное..., 1968; Перт, 1978; Стейниер и др., 1979; Шлегель, 1987).

Якщо позначити об'єм культиватора через V [л], а швидкість надходження живильного середовища – *швидкість притоку* – через f [л/год], то *швидкість розведення* D [1/год] буде дорівнювати $D = f/V$. Величина D визначає число об'ємів середовища, що проходять крізь культиватор за 1 годину. Величина, обернена до D , $1/D$, визначає середній час перебування мікроорганізмів у культиваторі. Якщо б після запуску хемостата водорості (X [г/л]) не росли, то вони б вимивались з нього зі *швидкістю вимивання*, що дорівнює

$$-DX = dX/dt. \quad (2.19)$$

Густина суспензії в культиваторі знижувалась би в цьому випадку експоненційно $X = X_0 \exp(-Dt)$. Якщо живильне середовище надходить зі швидкістю, більшою, ніж швидкість розмноження мікроорганізмів (мікроводоростей) за даних умов, $D > \mu$, то клітини будуть вимиватися з культиватора і, відповідно, густина суспензії буде зменшуватися. Якщо $D < \mu$, швидкість розведення буде меншою за швидкість росту, густина суспензії буде зростати, а при $D = \mu$ концентрація біомаси культури встановлюється на постійному рівні. Густина суспензії мікроорганізмів визначається швидкістю росту популяції клітин і швидкістю вимивання з культиватора. Мікроводорості в культиваторі також ростуть експоненційно і швидкість приросту визначається виразом

$$dX/dt = \mu X,$$

тобто експоненційно збільшується густина суспензії

$$X = X_0 \exp(\mu t).$$

Таким чином, швидкість зміни густини суспензії в культиваторі дорівнює алгебраїчній сумі величин μX та $-DX$

$$dX/dt = \mu X - DX. \quad (2.20)$$

Якщо швидкість росту μ і швидкість розведення D рівні, то втрати в результаті вимивання клітин і приріст біомаси врівноважуються і густина суспензії мікроорганізмів X залишається постійною. Культура знаходиться при цьому в стані динамічної рівноваги. Експоненційне розмноження клітин компенсується іншим експоненційним процесом, який веде до зменшення їх числа.

Управління і контроль за процесом неперервного культивування мікроорганізмів здійснюється хемостатним і турбідостатним способом.

Ріст у хемостаті. Теоретичні основи хемостатного культивування були розроблені Моно та Сцілардом і Новиком у 1949 році (Непрерывное..., 1968; Перт, 1978; Стейниер и др., 1979; Шлегель, 1987).

Хемостат складається з ємності для культивування мікроорганізмів (водоростей), в яку з іншого резервуару надходить з постійною швидкістю живильний розчин і з такою ж швидкістю відбувається відтік культурального середовища. В ємності для культивування відбувається перемішування і завдяки цьому – насичення розчину CO_2 та рівномірний розподіл поживних речовин, які надходять до культиватора. По мірі надходження в культиватор живильного середовища з такою ж швидкістю відбувається відтік суспензії мікроорганізмів. Іноді процес додавання живильного середовища і видалення культури відбувається ступінчасто, тобто дискретними порціями.

Ріст культури в хемостаті контролюється концентрацією субстратів. Як правило, живильне середовище, що подається до культиватора, містить у надлишку компоненти живлення за винятком якогось одного, наприклад азоту, фосфору, сірки, фактора росту і т.п., який у кожному конкретному випадку гальмує ріст популяції мікроорганізмів. У ролі фактора, який обмежує ріст, можуть бути й інгібітори, несприятливі значення рН середовища, а для мікроводоростей – і погіршення світлових умов в об'ємі культиватора в процесі наростання.

Як уже відзначалося, питома швидкість росту μ в залежності від концентрації субстрату, який лімітує ріст, описується рівнянням Моно (2.5). При хемостатному культивуванні мікроорганізмів динамічна рівновага встановлюється при $\mu = D$, і рівняння Моно можна записати так:

$$\mu_{\max} \frac{S}{S + K_s} = D.$$

Вирішивши це рівняння відносно S (концентрація субстрату):

$$S = K_s \frac{D}{\mu_{\max} - D}, \quad (2.21)$$

отримаємо зв'язок між S , який лімітує ріст у культиваторі, і швидкістю розведення D .

Ріст у турбідостаті. Назва “турбідостат” походить від англ. *Turbidity* – мутність, густина. В ємності, де вирощують водорості, підтримується постійна густина суспензії або постійна мутність. Датчик мутності регулює через систему управління надходження поживного розчину. В ємності для культивування поживні речовини є в надлишку, і швидкість росту водоростей (мікроорганізмів) наближається до максимальної. Обслуговування турбідостата технічно складніше, ніж хемостата (Непрерывное..., 1968; Перт, 1978; Стейниер и др., 1979; Шлегель, 1987).

Періодичне та неперервне культивування принципово відрізняються. Періодичну культуру можна розглядати як замкнену систему (певною мірою подібну до багатоклітинного організму), яка проходить у своєму розвитку чотири фази (або сім). Умови існування культури в усіх фазах різні. Автоматичне регулювання в періодичній культурі практично неможливе.

Неперервна культура являє собою відкриту систему, яка спрямована на встановлення динамічної рівноваги. Фактор часу до деякої міри виключається. Для мікроорганізмів створюють постійні незмінні умови живильного середовища. Установка може бути повністю автоматизована.

Врожай для неперервної культури. У випадку неперервної культури система для культивування відкрита і відбувається постійний (або періодичний) відбір водоростей і додавання живильного середовища в культиватор. Культура постійно підтримується в експоненційній (логарифмічній) фазі, тобто в фазі найбільш активного росту. У зв'язку з цим урожай визначають віднесенням біомаси мікроводоростей до площі збору і часу, протягом якого вирощувалися водорості:

$$\text{ВРОЖАЙ} = [\text{біомаса}] / [\text{площа збору}] \cdot [\text{час}]. \quad (2.22)$$

Врожай розраховують також не на одиницю площі культиватора, а на одиницю об'єму культиваційної установки.

3. ЖИВЛЕННЯ МІКРОВОДОРОСТЕЙ

3.1. Потреби мікроводоростей у поживних речовинах

За оптимальних умов мікроводорості швидко ростуть, споживаючи мінеральні солі, світло, воду й CO_2 . Наростання їх біомаси відбувається за рахунок реакцій енергетичного і конструктивного метаболізму (від грецьк. *metabole* — перетворення). Енергетичний метаболізм – це сукупність реакцій поглинання світла і перетворення світлової енергії на хімічну у формі АТФ, яка використовується в усіх метаболічних процесах. Конструктивний метаболізм (біосинтез) – це сукупність реакцій, у результаті яких з речовин, що надходять у клітини ззовні, синтезуються всі клітинні компоненти за рахунок хімічної енергії, яка акумулюється у формі АТФ. Хімічні сполуки, які беруть участь в обміні речовин, називаються метаболітами. Високовпорядкована система хімічних реакцій у клітині складається з метаболічних шляхів, перебіг яких забезпечується специфічними ферментами (ензимами). Така інтенсивна хімічна діяльність спрямована на забезпечення швидкого розмноження і виживання мікроводоростей при зміні умов існування.

Метаболічні реакції розділяють на три групи: *анаболізм*, *амфіболізм* і *катаболізм*. Етапи біосинтезу клітинних структур (синтез біополімерів і будівельних блоків) складають синтетичну гілку метаболізму (*анаболізм*). Анаболічні реакції спрямовані на утворення й оновлення структурних елементів клітин і на синтез складних молекул з більш простих. Ці реакції переважно відновлювальні і супроводжуються затратою вільної хімічної енергії (ендергонічні реакції). Процеси розщеплення, які відбуваються з виділенням енергії і які постачають клітинам необхідний “будівельний матеріал”, називають *катаболічними* (*катаболізм*). До них відносять процеси розщеплення складних молекул до простих компонентів. Ці реакції, як правило, окиснювальні і супроводжуються виділенням вільної хімічної енергії (екзергонічні реакції). У ході реакцій *проміжного обміну* або *амфіболізму*, утворюється цілий ряд органічних кислот і фосфорних ефірів. Проміжний метаболізм являє собою складну сітку реакцій, у ході яких органічні сполуки розщеплюються, взаємоперетворюються і синтезуються. Велике різноманіття таких сполук – це ті субстрати, з яких синтезуються основні будівельні “блоки” клітини. До основних будівельних “цеглин” відносять моносахариди, амінокислоти, пуринові та піримідинові основи, органічні кислоти і ряд інших метаболітів, які є кінцевими продуктами метаболічних шляхів. З них синтезуються біополімери (макромолекули) – нуклеїнові кислоти, білки, полісахариди, ліпіди і т.п. Структура організмів, постійність концентрацій більшості біомолекул навіть у стані спокою підтримується не статично, а динамічно. Тобто навіть у стані видимого спокою проходять

обмінні процеси, причому розщеплення (катаболізм) компенсується процесами синтезу (анаболізму). Енергію, яку витрачає організм у стані спокою, називають *енергією підтримання*.

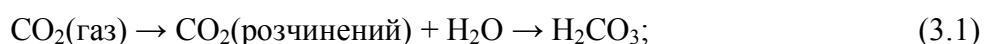
За винятком деяких специфічних моментів, біохімічні шляхи, за якими здійснюється синтез білків, жирів, вуглеводів і нуклеотидів у мікроводоростей, подібні до таких в інших організмів. Проте вони розрізняються за числом можливих шляхів і, відповідно, за ступенем залежності від надходження органічних речовин ззовні. Мікроводорості можуть синтезувати всі необхідні їм органічні молекули з неорганічних сполук, тобто є *автотрофами*, на відміну від *гетеротрофів* (бактерій, грибів і тварин), які забезпечують свою життєдіяльність за рахунок готових органічних сполук. Останні вони здатні лише трансформувати. Для багатьох мікроорганізмів характерний лабільний метаболізм, який виявляється в перемиканні з одного типу живлення на інший. Наприклад, деякі фототрофні мікроорганізми можуть рости в темряві в гетеротрофних умовах. Такі організми прийнято називати факультативними автотрофами.

Мікроводорості є *облігатними фототрофами* і здатні використовувати органічні речовини в дуже обмеженій кількості, причому за всіх умов основним джерелом вуглецю для них служить вуглекислота. Але деякі види здатні до так званої *міксотрофії*, або змішаного типу живлення, тобто до одночасного використання в процесах біосинтезу вуглекислоти, яка асимілюється в процесі фотосинтезу, і органічних сполук, які надходять ззовні. Проте, як зазначено вище, більшість мікроводоростей характеризується постійністю своїх потреб у живленні.

3.2. Засвоєння мікроводоростями вуглецю

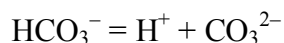
У конструктивному метаболізмі мікроводоростей головна роль належить вуглецю, який вони, як і інші автотрофні організми, отримують головним чином шляхом фіксації CO_2 .

На відміну від наземних рослин, які для фотосинтезу використовують CO_2 з повітря, водні організми засвоюють і інші форми вуглекислоти. У водному середовищі розчинений CO_2 взаємодіє з водою, утворюючи вугільну кислоту (H_2CO_3), яка існує в рівновазі з її аніонами – гідрокарбонатом HCO_3^- і карбонатом CO_3^{2-} :



Як видно з рівнянь 3.1 і 3.2, кількість, а також співвідношення H_2CO_3 , HCO_3^- CO_3^{2-} у воді залежить від pH, а також від концентрації солей, парціального тиску CO_2 в атмосфері і

температури. У кислому середовищі домінує вугільна кислота (вільний CO_2), при рН 7–9 домінує гідрокарбонат HCO_3^- , а при більш високих значеннях рН домінуючими стають аніони карбонату CO_3^{2-} (рис. 3.1). Вугільна кислота має два протони і, відповідно, дві константи дисоціації (два ступеня іонізації):



Константи дисоціації визначають таким чином:

$$K_1 = \frac{[\text{H}^+][\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]}, \quad K_2 = \frac{[\text{H}^+][\text{CO}_3^{2-}]}{[\text{HCO}_3^-]}.$$

$$K_1 = 4,3 \cdot 10^{-7} \text{ (моль/л)}.$$

$$K_2 = 5,6 \cdot 10^{-11} \text{ (моль/л)}.$$

Величина оберненого логарифма K_1 для першої стадії дисоціації $\text{p}K_1$ (утворення гідрокарбонату) відповідає значенню рН, при якому 50 % вугільної кислоти знаходиться в дисоційованій формі. Це значення складає 6,37, тобто знаходиться в області фізіологічних значень рН. Друга ступінь дисоціації – утворення карбонату, має $\text{p}K_2$ 10,25, унаслідок чого лужні розчини ефективно поглинають CO_2 з атмосфери, тоді як за низьких значень рН відбувається видалення CO_2 (отже, і H_2CO_3) з водних розчинів.

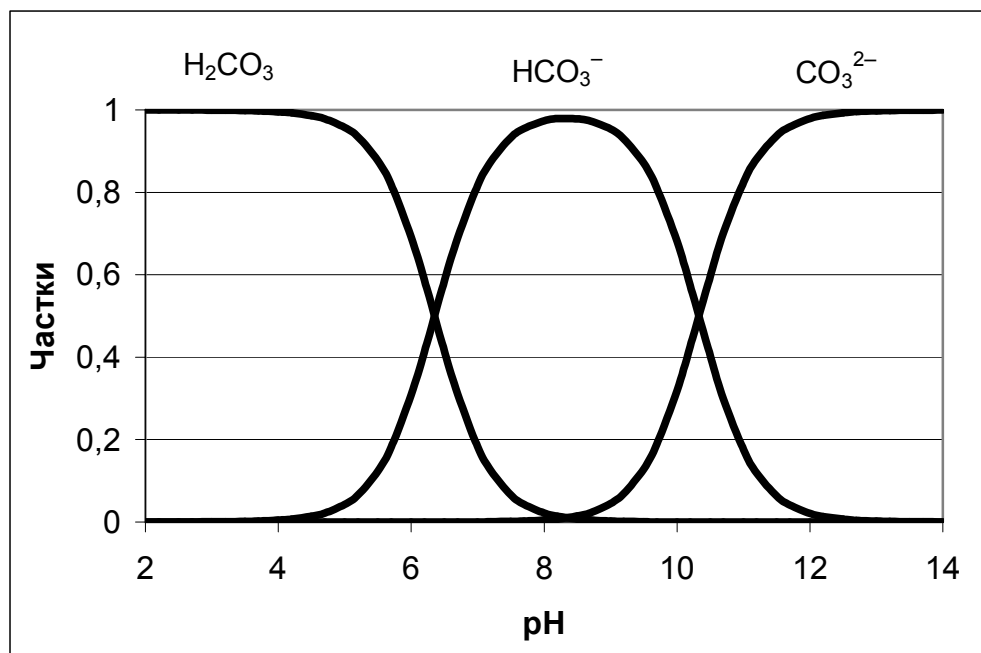


Рис. 3.1. Залежність відносного вмісту форм вугільної кислоти від рН середовища.

Для підрахунку частки різних форм дисоційованої вугільної кислоти використовують так звані функції Міхаеліса:

$$f_1 = \frac{A_{\text{tot.}}}{[\text{H}_2\text{CO}_3]}, \quad f_2 = \frac{A_{\text{tot.}}}{[\text{HCO}_3^-]}, \quad f_3 = \frac{A_{\text{tot.}}}{[\text{CO}_3^{2-}]},$$

де $A_{\text{tot.}} = [\text{H}_2\text{CO}_3] + [\text{HCO}_3^-] + [\text{CO}_3^{2-}]$.

Використовуючи константи дисоціації, можна представити рН функції Міхаеліса в іншому вигляді, а саме через константи дисоціації та концентрацію іонів водню, тобто рН:

$$f_1 = \frac{[\text{H}_2\text{CO}_3]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]} + \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]} + \frac{[\text{CO}_3^{2-}]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]}.$$

З виразів для констант дисоціації маємо:

$$[\text{HCO}_3^-] = \frac{K_1 [\text{H}_2\text{CO}_3]}{[\text{H}^+]},$$

$$[\text{CO}_3^{2-}] = \frac{K_2 [\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}^]}.$$

Комбінуючи ці вирази, отримуємо:

$$[\text{CO}_3^{2-}] = \frac{K_1 K_2 [\text{H}_2\text{CO}_3]}{[\text{H}^+]^2}.$$

Таким чином, для $f_1 = A_{\text{tot.}} / [\text{H}_2\text{CO}_3]$ отримуємо:

$$f_1 = \frac{[\text{H}_2\text{CO}_3]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]} + \frac{K_1 [\text{H}_2\text{CO}_3]}{[\text{H}^+] [\text{H}_2\text{CO}_3]} + \frac{K_1 K_2 [\text{H}_2\text{CO}_3]}{[\text{H}^+]^2 [\text{H}_2\text{CO}_3]},$$

$$f_1 = 1 + K_1/[\text{H}^+] + K_1 K_2 / [\text{H}^+]^2;$$

$$f_2 = \frac{[\text{H}^+] [\text{HCO}_3^-]}{K_1 [\text{HCO}_3^-]} + \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{HCO}_3^-]} + \frac{K_2 [\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}^+] [\text{HCO}_3^-]},$$

$$f_2 = [\text{H}^+]/K_1 + 1 + K_2/[\text{H}^+];$$

$$f_3 = \frac{[\text{CO}_3^{2-}]}{[\text{CO}_3^{2-}]} + \frac{[\text{H}_2\text{CO}_3]}{[\text{CO}_3^{2-}]} + \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_3^{2-}]},$$

$$f_3 = 1 + [\text{H}^+]^2/K_1 K_2 + [\text{H}^+]/K_2.$$

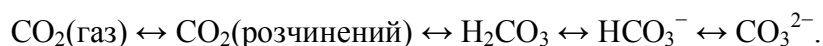
Величини, обернені до рН функцій Міхаеліса $1/f - (1/f_1 = [\text{H}_2\text{CO}_3]/A_{\text{tot.}}$ і т.д.), дають частку кожної форми у водних розчинах у залежності від рН середовища. Ці залежності представлені на рис. 3.1, а окремі величини – у табл. 3.1.

Таблиця 3.1. Частка різних форм вугільної кислоти в залежності від рН середовища

pH	$\text{H}_2\text{CO}_3 (\text{CO}_2)$	HCO_3^-	CO_3^{2-}
1	0,999	$4,3 \cdot 10^{-7}$	$2,4 \cdot 10^{-17}$
2	0,999	$4,3 \cdot 10^{-6}$	$2,4 \cdot 10^{-15}$
3	0,999	$4,3 \cdot 10^{-4}$	$2,4 \cdot 10^{-11}$
4	0,996	$4,28 \cdot 10^{-3}$	$2,4 \cdot 10^{-9}$
5	0,959	$4,12 \cdot 10^{-2}$	$2,3 \cdot 10^{-7}$
5,65	0,838	0,161	$4,02 \cdot 10^{-6}$
6	0,699	0,3	$1,68 \cdot 10^{-5}$
6,37 (pK _{al})	0,499	0,499	
7	0,188	0,811	$4,54 \cdot 10^{-4}$
8	$2,26 \cdot 10^{-2}$	0,972	$5,44 \cdot 10^{-3}$
9	$2,20 \cdot 10^{-3}$	0,945	$5,29 \cdot 10^{-2}$
10	$1,49 \cdot 10^{-4}$	0,641	0,359
11	$3,52 \cdot 10^{-6}$	0,15	0,848
12	$4,08 \cdot 10^{-8}$	$1,75 \cdot 10^{-2}$	0,982

У водних середовищах, не ізольованих від атмосфери, встановлюється рівновага між вуглекислотою повітря, яка розчиняється у воді і може бути використана для живлення мікрободоростей, та іонізованими формами вугільної кислоти. У зв'язку з цим виникає необхідність розглянути процеси, які відповідають за поглинання вуглекислоти й утворення різних її форм.

Для розрахунку вмісту різних форм вугільної кислоти (CO_2) у воді враховують кілька рівноваг, що встановлюються між ними:



За даної температури склад чистого розчину CO_2 визначається парціальним тиском діоксиду вуглецю над розчином (P_{CO_2}). Відповідно до закону Генрі, при постійній температурі концентрація розчиненого газу $[\text{CO}_2]$ в даному розчиннику певного об'єму прямо пропорційна парціальному тиску газу в рівновазі з розчином і визначається рівнянням Генрі:

$$[\text{CO}_2]/P_{\text{CO}_2} = 1/k_c,$$

де k_c – константа Генрі, яка дорівнює 29,76 атм/М при 25 °С.

Виходячи з того, що при нормальному тиску $P_{\text{CO}_2} = 0,00035$ атм, концентрація розчиненого у воді CO_2 в рівновазі з атмосферним CO_2 становить

$$[\text{CO}_2] = P_{\text{CO}_2}/k_c = 0,00035/29,76 = 1,176 \cdot 10^{-5} \text{ М.}$$

У свою чергу, розчин CO_2 знаходиться в рівновазі з H_2CO_3 :

$$\text{CO}_2(\text{розчинений}) \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3, K_h = [\text{H}_2\text{CO}_3]/[\text{CO}_2] = 1,70 \cdot 10^{-3} \text{ при } 25 \text{ }^\circ\text{С.}$$

Таким чином, концентрація вугільної кислоти у воді, яка знаходиться в рівновазі з повітрям, складає: $[\text{H}_2\text{CO}_3] = K_h [\text{CO}_2] = 1,70 \cdot 10^{-3} \times 1,176 \cdot 10^{-5} = 2,0 \cdot 10^{-8} \text{ М.}$

Для того, щоб розрахувати частку різних форм неорганічного вуглецю (Сi) – $\text{CO}_2(\text{розчинений})$, H_2CO_3 ; HCO_3^- ; CO_3^{2-} в умовах рівноваги вуглекислого газу з розчином, потрібно вирішити шість рівнянь для шести невідомих $[\text{CO}_2]$, $[\text{H}_2\text{CO}_3]$, $[\text{H}^+]$, $[\text{OH}^-]$, $[\text{HCO}_3^-]$, $[\text{CO}_3^{2-}]$:

$$[\text{CO}_2] = P_{\text{CO}_2}/k_c,$$

$$\text{H}_2\text{CO}_3 = K_h [\text{CO}_2],$$

$$[\text{HCO}_3^-] = (K_{a1} [\text{H}_2\text{CO}_3])/[\text{H}^+],$$

$$[\text{CO}_3^{2-}] = (K_{a2} [\text{HCO}_3^-])/[\text{H}^+],$$

$$[\text{H}^+] [\text{OH}^-] = 10^{-14},$$

$$[\text{H}^+] = [\text{OH}^-] + [\text{HCO}_3^-] + 2 [\text{CO}_3^{2-}].$$

Останнє рівняння визначає електронейтральність розчину. Його розв'язок дає значення рН води при різних парціальних тисках CO_2 . Враховуючи, що концентрація $[\text{CO}_3^{2-}]$ за звичайних умов невисока, вираз спрощується і дає аналітичне рівняння для визначення величини рН за різних рівнів парціального тиску CO_2 :

$$[\text{H}^+] = [10^{-14} + (K_h \cdot K_{a1}/k_c) \cdot P_{\text{CO}_2}]^{1/2}.$$

З табл. 3.2 видно, що рН води при всіх рівнях CO_2 значно нижче, ніж значення pK_{a2} , оскільки концентрація CO_3^{2-} завжди є незначною порівняно з концентрацією HCO_3^- .

Очевидно, що зі зниженням вмісту CO_2 в повітрі рН наближається до значення, характерного для чистої води ($\text{pH} = 7$), а розчинена вуглекислота повітря перебуває переважно у формі HCO_3^- .

Таблиця 3.2. Концентрація різних форм неорганічного вуглецю для різних значень парціального тиску CO_2 над водним розчином

$P_{\text{CO}_2, \text{ атм}}$	pH	Концентрація, М			
		$[\text{CO}_2]$	$[\text{H}_2\text{CO}_3]$	$[\text{HCO}_3^-]$	$[\text{CO}_3^{2-}]$
$3,5 \cdot 10^{-4}$	5,65	$1,18 \cdot 10^{-5}$	$2,00 \cdot 10^{-8}$	$2,23 \cdot 10^{-6}$	$5,60 \cdot 10^{-11}$
10^{-3}	5,42	$3,36 \cdot 10^{-5}$	$5,71 \cdot 10^{-8}$	$3,78 \cdot 10^{-6}$	$5,61 \cdot 10^{-11}$
10^{-2}	4,92	$3,36 \cdot 10^{-4}$	$5,71 \cdot 10^{-7}$	$1,19 \cdot 10^{-5}$	$5,61 \cdot 10^{-11}$
10^{-1}	4,42	$3,36 \cdot 10^{-3}$	$5,71 \cdot 10^{-6}$	$3,78 \cdot 10^{-5}$	$5,61 \cdot 10^{-11}$
1	3,92	$3,36 \cdot 10^{-2}$	$5,71 \cdot 10^{-5}$	$1,20 \cdot 10^{-4}$	$5,61 \cdot 10^{-11}$
10	3,42	0,336	$5,71 \cdot 10^{-4}$	$3,78 \cdot 10^{-4}$	$5,61 \cdot 10^{-11}$

За нормального атмосферного тиску ($P_{\text{CO}_2} = 0,00035$ атм) вода є слабко кислим розчином (pH = 5,7), а розчинена вуглекислота перебуває переважно у формі CO_2 . За цих умов концентрація OH^- є також незначною, оскільки іонна рівновага забезпечується еквімолярною сумішшю H^+ і HCO_3^- . У газованих напоях парціальний тиск CO_2 складає близько 2,5 атм і, відповідно, pH приблизно дорівнює 3,7 при відносно високих значеннях розчиненого CO_2 . Цим пояснюється кислий смак цих напоїв.

При парціальних тисках від 2,5 до 10 атм pH води наближується до значення pK_{a1} (3,60), що вказує на домінування H_2CO_3 за цих умов.

3.3. Мінеральне живлення

Мінеральне живлення мікрободоростей – це сукупність процесів поглинання та засвоєння необхідних для життєдіяльності клітин хімічних елементів у формі іонів неорганічних солей. Найважливішим компонентом мінерального живлення є неорганічний вуглець, який надходить до живильного розчину внаслідок барботування середовища повітрям з додаванням CO_2 , а також солей вугільної кислоти. Основу живильних середовищ для культивування мікрободоростей складають водні розчини неорганічних солей, які містять азот, калій, фосфор та інші макроелементи, а також мікроелементи. Елементи мінерального живлення поглинаються всією клітинною поверхнею мікрободоростей: азот надходить у вигляді аніона NO_3^- або катіона NH_4^+ , фосфор і сірка – у вигляді аніонів PO_4^{3-} і SO_4^{2-} , метали – у формі катіонів K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} . Аналіз сухої маси рослин і водоростей показує, що частка вуглецю складає близько 45 %, кисню – 42 %, водню 6-6,5 %, азоту – 1,5 %, зольних елементів – 5 %. Хімічні елементи рослинної біомаси, виходячи з їх вмісту,

прийнято поділяти на три групи: основні елементи (C, O, H), макроелементи і мікроелементи (Упитис, 1983; Шлегель, 1987).

Основні елементи. Вуглець (C), водень (H) і кисень (O), що складають більше 90 % вмісту сухої біомаси, часто не відносять до мінеральних елементів і виділяють в окрему групу основних елементів.

Макроелементи. У цю групу входять елементи, вміст яких у сухій масі рослини коливається від кількох відсотків до десятих часток відсотка. Сюди відносяться: азот (N), калій (K), кальцій (Ca), фосфор (P), сірка (S), магній (Mg), кремній (Si), натрій (Na), залізо (Fe).

Мікроелементи. До мікроелементів відносяться елементи, вміст яких у сухій масі рослини складає від тисячних до стотисячних часток відсотка. До цієї групи входять марганець (Mn), бор (B), мідь (Cu), літій (Li), йод (I), бром (Br), нікель (Ni), молібден (Mo), кобальт (Co), хлор (Cl), селен Se (табл. 3.3).

Таблиця 3.3. Середній вміст хімічних елементів у біомасі рослин, водоростей і бактерій

Хімічні елементи	Вміст, % сухої біомаси		
	рослин	водоростей	бактерій
Основні елементи			
H	6-7	6-8	8
C	40-45	34-37	50
O	42-45	45-50	20
Мікроелементи			
N	1,5	6-9	10-14
P	0,2	0,5-2	1-3
K	1,0	1,0-1,5	0,5-1
Ca	0,5	0,3-0,6	0,5
Mg	0,2	0,2-0,6	0,5
S	0,1	0,1-0,6	0,6-1
Si	1,5	6-9	10-14
Мікроелементи (сумарний вміст)			
Cl, Fe, B, Mn, Na, Zn, Cu, Ni, Mo, Se, Co	~ 0,1-0,2*		

* – Вміст окремих мікроелементів знаходиться в межах 0,1 – 100 ppm.

Залежність фотосинтезу від елементів мінерального живлення визначається, у першу чергу, їх необхідністю для формування фотосинтетичного апарату (пігментів, компонентів електронтранспортного ланцюга, каталітичних систем хлоропластів, структурних і транспортних білків), а також для постійного його оновлення в процесі функціонування.

Магній входить до складу хлорофілів, бере участь у діяльності спряжених білків при синтезі АТФ, впливає на активність реакцій карбоксилювання і відновлення НАДФ, унаслідок чого його нестача порушує процес фотосинтезу.

Залізо у відновленій формі необхідне для процесів біосинтезу хлорофілу і залізовмісних сполук хлоропластів (цитохромів, фередоксину). Дефіцит заліза різко порушує функціонування циклічного і нециклічного фотофосфорилування, синтез пігментів і змінює структуру хлоропластів.

Необхідність марганцю для фотосинтетиків пов'язана з його роллю в окисненні води, тому недостатність марганцю негативно відбивається на інтенсивності фотосинтезу. Для системи фотоокиснення води потрібен також хлор.

Мідь входить до складу пластоціаніну, тому в рослин дефіцит міді викликає зниження інтенсивності фотосинтезу.

Нестача азоту суттєво впливає на формування пігментних систем, структур хлоропласта та його загальну активність. Концентрація азоту визначає кількість і активність рибулозодифосфаткарбоксилази.

За умов нестачі фосфору порушуються фотохімічні та темнові реакції фотосинтезу. Особливо різко дефіцит фосфору проявляється при високій інтенсивності світла, при цьому більш чутливими виявляються темнові реакції. Однак при зменшенні вмісту фосфору в два рази інтенсивність фотосинтезу знижується в меншому ступені, ніж ростові процеси і загальна продуктивність рослин. Надлишок фосфору також гальмує швидкість фотосинтезу, імовірно, унаслідок зміни проникності мембран.

Зменшення вмісту калію в тканинах супроводжується значним зниження інтенсивності фотосинтезу і порушеннями інших процесів у рослині. У хлоропластах вищих рослин спостерігаються зміни структури гран, крім того, продихи слабо відкриваються на світлі і недостатньо замикаються в темряві, погіршується водний режим листка, порушуються всі процеси фотосинтезу.

Слід відмітити, що як нестача, так і значний надлишок елементів мінерального та органічного живлення може негативно впливати на біооб'єкти (рис. 3.2). Яскравим прикладом негативного впливу надлишку поживних речовин на стан водних екосистем є бурхливий розвиток фітопланктону, так зване "цвітіння" води, яке викликає забруднення прісних водойм і їх отруєння. Цей процес спостерігається при збагаченні води сумішшю

органічних сполук, вилужених з навколишнього ґрунту. Інтенсифікацію розвитку фітопланктону більшою мірою викликають фосфати, ніж нітрати. Найчастіше спостерігають “цвітіння” в прісних, стоячих водах: в озерах, ставках, басейнах, канавах і дощових калюжах, іноді воно відмічається в морських бухтах зі слабо солонуватою водою. “Цвітіння” води викликається одноклітинними, а іноді і колоніальними водоростями, переважно зеленими і синьозеленими.



Рис. 3.2. Залежність “фізіологічної відповіді” організму від концентрації елементів живлення.

3.4. Характеристика живильних середовищ для культивування мікроводоростей

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 мікроводоростей. Воно включає тільки неорганічні солі і воду.

Селективне середовище. Використовується для росту тільки певних відібраних організмів. Наприклад, якщо мікроводорості 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.

Транспортне середовище. Використовується для тимчасового зберігання і транспортування мікроводоростей для подальшого культивування. Транспортне середовище добре підтримує життєстійкість мікроводоростей без зміни їх концентрацій. Таке середовище містить тільки буфери і солі. Відсутність азоту, фосфору та органічних факторів росту стримує ріст мікроводоростей.

Збагачене середовище. Містить поживні елементи, які потрібні для росту цілого ряду мікроводоростей, включаючи і такі, розвиток яких вимагає дотримання специфічних умов.

Запропоновано багато різних живильних середовищ для культивування мікроводоростей 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.

Розробляючи або модифікуючи живильне середовище, необхідно враховувати наступне:

- 1) концентрацію і склад іонів таких макроелементів, як калій, магній, сірка, фосфор;
- 2) 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 мікроводоростей містять 6-9 % азоту в перерахунку на суху біомасу. Виходячи з цього, можна оцінити потребу водоростей в азоті. Зокрема, для утворення 1 г біомаси в 1 л культуральної суспензії потрібно 0,5-0,6 г $\text{KNO}_3 \text{ л}^{-1}$;
- 3) джерела вуглецю. Вуглець як правило, вводять у вигляді вуглекислого газу в суміші з повітрям, або у вигляді бікарбонату. Треба відмітити, що вибір джерела вуглецю значною мірою залежить від рН, оптимального для росту організму;
- 4) мікроелементи. Як правило, їх вносять у вигляді сумішей, враховуючи попередньо експериментально встановлену концентрацію кожного з мікроелементів для забезпечення активного росту водоростей. Для стабілізації суміші мікроелементів використовують комплексоутворюючі сполуки, наприклад ЕДТА;
- 5) вітаміни, фактори росту. Для росту багатьох видів водоростей необхідні вітаміни, наприклад B_{12} (кобаламін).

3.5. Склад мінеральних середовищ

Середовище BG-11 (Kuhl, 1962; Rippka et al., 1979) – Cyanophyta (мг/л):

NaNO_3^* – 1500; K_2HPO_4 – 40; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 75; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 36; лимонна кислота – 6; $2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe} \cdot \text{C}_6\text{H}_7\text{O}_7\text{NH}_4$ – 6; Na_2 -ЕДТА – 1; Na_2CO_3 – 20; мікроелементи – 1 мл/л.

Розчин мікроелементів (мг/л): H_3BO_3 – 61; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 169; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 287; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 2,5; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 12,5.

*Якщо потрібне середовище без азоту, NaNO_3 замінюють на NaCl (1021 мг/л).

Середовище Фітцджеральда в модифікації А. Цендера і П. Горхема (Zehnder, Gorham, 1960) – *Nostoc* Adan., *Anabaena* Bory (без азоту), *Microcystis* (Kütz.) Elenk. (мг/л):

NaNO_3 – 496; K_2HPO_4 – 39; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 75; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 36; Na_2CO_3 – 20; $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ – 58; $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}$ – 6; лимонна кислота – 6; ЕДТА – 1; мікроелементи – 0,08 мл/л.

Розчин мікроелементів (г/л): H_3BO_3 – 3,1; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 2,23; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,287; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,088; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,146; Na_2WO_4 – 0,033; KBr – 0,119; KI – 0,083; $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,154; $\text{NiSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,198; $\text{VOSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 0,020; $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ – 0,474; $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 7,5 \text{H}_2\text{O}$ – 0,037.

Середовище С. Заррука (Zarrouk, 1966) – *Spirulina* Turp., *Oscillatoria* Vauch. (г/л):

NaHCO_3 – 16,8; K_2HPO_4 – 0,5; NaNO_3 – 2,5; K_2SO_4 – 1,0; NaCl – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; CaCl_2 – 0,04; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; ЕДТА – 0,08; мікроелементи – по 1 мл кожного розчину на 1 л.

Розчин мікроелементів 1 (г/л): H_3BO_3 – 2,86; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 1,81; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,22; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,08; MoO_3 – 0,015.

Розчин мікроелементів 2 (мг/л): NH_4VO_3 – 23,00; $\text{K}_2\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_4 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ – 96,00; $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 47,85; $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 17,94; $\text{Ti}_2(\text{SO}_4)_3$ – 40,00; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 44,00.

рН середовища 8,3-8,4.

Середовище № 6 Б.В. Громова (Громов, Титова, 1983) – види Chroococcophyceae і Hormogoniophyceae (Cyanophyta), *Ankistrodesmus* Corda, *Chlorella* Beijer. (Chlorophyta) (г/л):

KNO_3 – 1,0; K_2HPO_4 – 0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; CaCl_2 – 0,15; NaHCO_3 – 0,2; мікроелементи – 1 мл/л.

Розчин мікроелементів (г/л): $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,22; MnSO_4 – 1,81; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,079; $\text{NaBO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 2,63; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 9,3; CaCl_2 – 1,2; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,02; ЕДТА – 10,0.

Середовище № 1 Б.В. Громова (Громов, Титова, 1983) – *Chlorella* Beijer. (мг/л):

K_2HPO_4 – 66,7; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 33,3; KNO_3 – 100,0; мікроелементи – 1 мл/л.

Розчин мікроелементів (г/л): $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,22; $MnSO_4$ – 1,81; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0,079; $NaBO_2 \cdot 4H_2O$ – 2,63; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ – 1,0; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 9,3; $CaCl_2$ – 1,2; $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ – 0,02; ЕДТА – 10,0.

Середовище Тамія, модифіковане (Кузнецов, Владимірова, 1964) – *Chlorella* Beijer. (г/л):

KNO_3 – 5,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 2,5; KH_2PO_4 – 1,25; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,009; ЕДТА – 0,037; мікроелементи – 1 мл/л.

Розчин мікроелементів (г/л): H_3BO_3 – 2,86; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ – 1,81; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,222; MoO_3 – 0,018; NH_4VO_3 – 0,023.

Середовище В.Г. Ладигіна (Ладыгин, 1991) – *Chlamydomonas* Ehr. (г/л):

NH_4Cl – 0,40; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,10; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0,05; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ – 0,717; KH_2PO_4 – 0,363; $C_6H_7O_7Na$ – 0,50; мікроелементи – 1 мл/л.

Розчин мікроелементів (г/л): $ZnSO_4$ – 22,0; H_3BO_3 – 11,40; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ – 5,06; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 4,99; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ – 1,61; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ – 1,57; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ – 1,10; ЕДТА – 50,0.

Модифіковане середовище ЧУ 13 (Brown et al., 1969; Largeau et al., 1980) (г/л): – *Botryococcus braunii* (Kütz.)

KNO_3 – 0,2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,1; лимонна кислота – 0,1; $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0,08; K_2HPO_4 – 0,04; $C_6H_5O_7Fe$ – 0,01; мікроелементи – 1 мл/л.

Розчин мікроелементів (г/л): H_3BO_3 – 2,8632; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ – 1,8030; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2201; $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ – 0,0989; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0,0787; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ – 0,0368. Перед автоклавуванням рН доводять до 7,5 за допомогою КОН.

3.6. Приготування живильних середовищ

Головними факторами, які впливають на стабільність живильного середовища, є природа його компонентів, здатність їх взаємодіяти один з одним, температура, рН, освітленість, забезпечення киснем.

Розглянемо вплив деяких з цих факторів на неорганічні компоненти живильного середовища.

Для запобігання випадінню осаду в живильному середовищі необхідно враховувати, що солі амонію слід автоклавувати при рН нижче 7, в іншому випадку деяка частина азоту може втратитися внаслідок утворення аміаку. Основні втрати іонів магнію, калію, амонію, натрію та фосфату можуть відбуватися при осадженні солей, які важко розчиняються. Погано розчиняються змішані фосфорнокислі солі магнію та амонію, магнію і калію, магнію і натрію. У зв'язку з цим сіль магнію потрібно автоклавувати окремо від фосфатів. Розчинність сульфату кальцію складає приблизно 0,2 %, а фосфорна сіль розчинна дуже слабо. У середовищі, що не має агентів, які утворюють комплекси, практично всі іони заліза можуть випасти в осад, якщо не проводити значного підкислення середовища. Фільтри Зейтца можуть адсорбувати іони заліза.

Природні середовища, як правило, містять амінокислоти та інші сполуки, що хелатують мікроелементи. Багато мінімальних середовищ не мають агентів, які утворюють комплекси, що призводить до осадження заліза та інших мікроелементів. Використовуються також суміші мікроелементів у вигляді сухих порошоків.

Протягом кількох перших годин після приготування розчину осадження може і не відбуватись.

У біотехнологічному виробництві всі операції з приготування живильного середовища відбуваються в спеціалізованому цеху, який обладнаний ємностями для зберігання рідких і твердих речовин, засобами їх транспортування, апаратами з перемішувачами пристроями для приготування розчинів або суспензій. При цьому хімічні солі, які є компонентами живильних сумішей, зберігаються зазвичай у твердому стані. При запуску ферментера приготування їх розчинів із заданим співвідношенням компонентів проводиться за наступною схемою. Кожний компонент живильного середовища в необхідній кількості згідно з рецептурою зважують на технічних терезах і окремо розчиняють у воді в спеціальних ємностях, постійно перемішуючи за допомогою мішалок. Приготовані розчини мінеральних солей по черзі вносять у ферментер і ретельно перемішують. При безперервному культивуванні розчини солей вводять у ферментер роздільно по індивідуальних лініях.

Для забезпечення необхідного рівня вуглецевого живлення суспензію мікробіодоростей постійно барботують повітрям з додаванням вуглекислоти крізь спеціальні пристрої.

При періодичній ферментації на початку процесу інокулянт мікробіодоростей вноситься вже до готового живильного середовища, яке містить усі компоненти. Джерела вуглецю вводять безпосередньо перед засівом або окремі компоненти середовища вводять по мірі споживання їх культурою, підтримуючи в ферментері деяку оптимальну їх концентрацію, яка на різних етапах ферментації може змінюватись за певним законом.

Найважливішим елементом приготування живильних середовищ є дотримання вимог асептики. Це, як правило, повна стерилізація всіх потоків, що подаються, і самого біореактора, або створення такого значення рН, яке забезпечує пригнічення сторонніх мікроорганізмів.

Для стерилізації газових потоків (у першу чергу повітря) використовують процес фільтрації крізь спеціальні волокнисті фільтри з послідовно розташованими фільтруючими елементами. Фільтруючий матеріал періодично стерилізують, подаючи гостру пару у відключений фільтр через задані проміжки часу. Рідинні потоки стерилізують різними методами, з яких практичний інтерес представляють термічний, радіаційний, фільтрація і частково хімічний.

Термічний – найпоширеніший, за температури порядку 120-150 °С.

Радіаційний – стерилізація γ -випромінюванням застосовується рідко через складнощі в створенні і експлуатації потужних джерел цього випромінювання.

В окремих випадках застосовують хімічні стерилізуючі агенти (речовини з яскраво вираженою асептичною дією). Основною проблемою в цьому випадку є необхідність усунення стерилізуючого агента з живильного середовища після загибелі мікрофлори до внесення інокуляту. Хімічні антисептики повинні бути не тільки високоефективними, але й легко руйнуватись при зміні умов по завершенні стерилізації. До кращих з них належить пропіолактон, який виявляє сильну бактерицидну дію і легко гідролізується, утворюючи молочну кислоту.

Мало поширений і метод фільтрації, що пояснюється апаратними труднощами. Метод заснований на здатності напівпроникних мембран з крупними порами пропускати рідку фазу і концентрувати клітини мікроорганізмів. У принципі цей метод є ідеальним для стерилізації термічно нестійких рідких і газових засобів, оскільки може здійснюватися за низьких температур і вимагає лише градієнта тиску з різних боків мембрани. Основна складність цього методу – наявність термостійких мембран, здатних витримувати багаторазову стерилізацію їх самих. На сьогоднішній день ця проблема вирішується шляхом застосування термостійких полімерів при виробництві мембран.

3.7. Підтримка чистої культури і отримання посівного матеріалу

У технологічному процесі використовуються корисні властивості обраного штаму, тому необхідно зберігати і, якщо можливо, покращувати його виробничі якості. Зазвичай у біотехнологічному виробництві є відділення чистої культури, тобто підрозділ, завданням якого є постійне надійне відтворення популяції мікрободоростей зі збереженням корисних

властивостей продуцента, природних або досягнутих у ході лабораторних експериментів. У відділенні чистої культури проводять лабораторні операції по її контролю і збереженню, а також дрібномасштабне культивування для постійної передачі штаму в масове культивування. Фактично це альгологічна лабораторія з музеєм штамів-продуцентів. У ході контрольного висіву і маломасштабного культивування (у пробірках, колбах, тощо) аналізується стійкість усіх ознак, які існували або були надбані і послужили підставою для рекомендацій щодо промислового застосування цих культур. По мірі необхідності з відділення чистої культури надходить задана маса інокуляту, яка йде у виробництво.

При періодичному процесі культивування у відділенні чистої культури готують посівну дозу клітин для кожної з операцій основного виробництва. Посівні дози вирощуються послідовно в колбах і в ємностях на 10-20 літрів, що знаходяться на качалках або просто в термостатованому приміщенні, і далі в послідовності культиваторів об'ємом 10, 100, 500 або 1000 літрів, в яких здійснюється перемішування, аерація і термостатування культуральної рідини з клітинами.

Відділення чистої культури повинне мати достатньо велику колекцію штамів-продуцентів, оскільки можливі тимчасові переходи з одного штаму на іншій, викликані різними причинами. Наприклад, сезонні зміни температури частково компенсуються підбором достатньо продуктивних термотолерантних штамів.

Посів водоростей проводять альгологічно чистою культурою, яку вирощують у стерильних умовах. Культуру водоростей вносять до живильного середовища в кількості, що дає світло-зелене забарвлення (з початковою щільністю 0,1-0,15 одиниць оптичної щільності). Початкова концентрація становить близько 2 тис клітин / мл. На відміну від аксенічних культур, що містять тільки один біологічний вид (монокультура), альгологічно чиста культура водоростей не вільна від супутньої мікрофлори, але містить лише один вид водорості.

Вирощену культуру водорості можна зберігати протягом одного і більше місяців у холодильнику при температурі, близький до 0 °С. Неприпустиме повне або часткове промерзання суспензії.

Багато видів мікроводоростей існують в асоціаціях з різноманітними мікроорганізмами. Як відомо, взаємозв'язки синьозелених водоростей з мікроорганізмами мають складний характер. Здебільшого це симбіотичні відносини, а в деяких випадках – антагоністичні. Ідеальною екологічною нішею, яка сприятлива для росту і розвитку мікрофлори, є слизові утворення синьозелених водоростей.

Для вирішення низки питань, пов'язаних з відносинами синьозелених водоростей із супутньою мікрофлорою, поряд з альгологічно чистими культурами водоростей

використовуються аксенічні, бактеріально чисті культури, вільні від цих мікроорганізмів. Отримання останніх пов'язане зі значними труднощами, оскільки клітини і трихоми водоростей здебільшого мають слизові піхви або чохли, в яких розвивається супутня мікрофлора і які за розміром часто в багато разів перевищують розміри клітин самих водоростей.

Існує ряд рекомендацій щодо застосування певних методів і прийомів звільнення водоростей від супутніх мікроорганізмів, проте загальноприйнятих прийомів отримання аксенічних культур не існує. З цією метою рекомендують хімічну стерилізацію, яка передбачає підбір хімічних сполук, які дозволили б частково розчиняти слиз, який оточує водорості, і впливати на мікрофлору, яка там сконцентрована. Більш ефективними вважаються такі стерилізуючі фактори, як антибіотики, ультрафіолетові промені, γ -опромінення, а також різні хімічні сполуки. Застосування ультрафіолетового опромінення ґрунтується на особливій стійкості до нього синьозелених водоростей. Антибіотики як стерилізуючий агент відносно синьозелених водоростей не отримали такого широкого застосування, як ультрафіолетові промені. Вони більш успішно використовуються для очищення зелених і діатомових водоростей.

Запропонований метод фільтрування рідких культур крізь скляні фільтри з наступним підбором агентів, які були б ефективними для усунення супутньої мікрофлори і нешкідливими для водоростей.

Найчастіше використовують комбінації різних способів бактеріального очищення водоростей, наприклад таких прийомів, як промивання і центрифугування, застосування детергентів для звільнення від слизу, обробку антисептичними речовинами, наприклад фенолом, дію різних антибіотиків та їх суміші, наприклад пеніциліну, стрептоміцину і ауреоміцину, ультрафіолетового опромінення, тощо. Застосовувався також французький прес високого тиску, у результаті використання якого бактерії і гриби як більш ламкі, ніж синьозелені водорості, руйнуються, а водорості залишаються життєздатними. Використання ультразвуку потребує ретельного підбору режимів обробки, оскільки ця процедура часто призводить до дезінтеграції та загибелі водоростей (Методы..., 1975; Андреюк и др., 1990).

Найчастіше аксенічні культури синьозелених водоростей отримати складно. У випадку позитивного ефекту від дії комплексу певних способів очищення водоростей, у результаті застосування яких була отримана аксенічна культура, її бажано витримувати на твердих живильних середовищах при температурі, яка сприяє росту водоростей, при освітленості 500 лк. Азотфіксуючі водорості доцільно вирощувати на середовищі без азоту для підтримки їх азотфіксуючої здатності. Крім того, необхідною умовою належного зберігання аксенічних культур водоростей є періодична перевірка на можливу присутність супутніх бактерій.

Оскільки симбіоз синьозелених водоростей і супутньої мікрофлори носить здебільшого характер позитивного взаємовпливу цих компонентів, і в природних умовах вони функціонують саме у вигляді таких асоціацій, для розуміння фізіологічних і екологічних особливостей природних популяцій цих водоростей відповідні дослідження в багатьох випадках проводяться з використанням саме альгологічно чистих культур.

3.8. Колекційне забезпечення фонду штамів мікроводоростей

Розвиток наукових напрямків, спрямованих на проведення фундаментальних досліджень різноманіття видового складу мікроводоростей, їх біохімічної характеристики, пов'язаний з проблемою довгострокового збереження їх штамів. Особливої гостроти ця проблема набуває в зв'язку з розвитком біотехнологічних досліджень мікроводоростей, порівняльним вивченням їх біосинтетичного потенціалу. Спеціальна увага приділяється питанням функціональної активності фотосинтетичного апарату, дослідженням фізіолого-біохімічних характеристик культур, генетичних особливостей, пошуком нових перспективних штамів, які синтезують унікальні біохімічні компоненти, зі з'ясуванням можливості їх практичного використання.

У зв'язку з цим особливого значення набуває збереження існуючих та створення нових колекцій живих культур мікроводоростей, зокрема, генетичних банків штамів, у тому числі банків форм зі спадково зміненими ознаками. Ця робота постійно ведеться протягом багатьох десятиріч у провідних біологічних установах світу.

Колекції мікроводоростей створюються з метою забезпечення експериментальних робіт з цими об'єктами. Матеріал колекцій широко використовується для проведення робіт з морфології і систематики водоростей, вирішення питань біохімії, фізіології, біології, цитології, а також для вивчення спрямованого біосинтезу біологічно активних речовин.

Важливим завданням колекційної роботи є вдосконалення методів підтримки і збереження генофонду мікроводоростей, оцінка їх життєздатності в період і після зберігання, розробка ефективних методів їх консервації, способів утримання водоростей у життєздатному стані при забезпеченні незмінності морфологічних параметрів та стабільності біохімічних компонентів. Колекції включають моно- або аксенічні культури.

Найпоширенішим способом є використання агаризованих живильних середовищ, рекомендованих для культивування певних штамів мікроводоростей. Після посіву культур у пробірки з агаризованим середовищем вони протягом декількох діб підросшуються при освітленні люмінесцентними лампами. Надалі водорості знаходяться в холодильних установках, які обладнані системою освітлення низької інтенсивності. Основний фонд

культур зберігається при температурі 10-12 °С, термофільні водорості – у спеціальних приміщеннях при високих температурах. Це пов'язано з необхідністю підтримки на низькому рівні активності фотосинтетичного апарату, інших сторін метаболізму водоростей як фототрофних організмів, що сприяє забезпеченню їх життєдіяльності. Пересіви здійснюються кожні 2-3 місяці. Окремі водорості потребують спеціальних умов зберігання.

Постійно розробляються і вдосконалюються інші способи збереження водоростей, наприклад їх кріоконсервація, ліофілізація, застосування кріопротекторів, збереження водоростей шляхом їх зневоднення й переведення в стан ангідробіозу.

Способи отримання, очищення культур, зокрема бактеріального, конкретні умови зберігання та режим вирощування певних мікроскопічних водоростей, які відносяться до різних систематичних груп, у тому числі об'єктів біотехнологій, розглядаються в каталогах колекцій. У них наводиться інформація про місце виділення штаму з природи і спосіб його отримання. У випадку надходження штаму з іншої колекції вказується назва цієї колекції, а також наявність штаму в інших колекціях. Указуються фенотипові особливості штаму, окремі його властивості, зокрема аксенічність, середовище, на якому він підтримується в колекції. Публікуються також списки культур водоростей, які підтримуються в різних науково-дослідних інститутах біологічного профілю та на біологічних факультетах університетів (Культивирование..., 1983; Каталог..., 1991; Борисова, Царенко, 1997; Сиренко и др., 2005).

Невід'ємною частиною колекційної справи кожної наукової установи є інформаційне забезпечення наукової громадськості досягненнями в роботі з колекціями їх культур. З цією метою основні альгологічні колекції колишнього Радянського Союзу приймали участь у створенні інформаційного банку даних фондів штамів мікроводоростей. Ця інформація як джерело отримання певних штамів та відомостей про них є неоціненною для наукових і практичних працівників, які використовують водорості як об'єкти наукових досліджень і технологічних розробок. Вона може бути корисною для викладачів і студентів, застосовуватися в учбовому процесі.

4. ФОТОБІОРЕАКТОРИ

4.1. Типи фотобіореакторів

Нарощування біомаси в біотехнологічних виробництвах відбувається в спеціальних ємностях, так званих ферментерах або біореакторах, конструкція яких забезпечує дотримання оптимального температурного режиму, введення і відведення газових і рідких потоків, контроль за складом живильного середовища і умовами всередині реактора. У промисловій біотехнології виділяють два типи процесів – накопичення біомаси і накопичення цінних речовин, які виникають у ході початкового і подальшого розвитку культури. У залежності від цього біомаса одноклітинних організмів вирощується або безперервним способом в апаратах хемостатного типу, або періодично, коли в одному і тому ж апараті у виробничому циклі протікають усі необхідні фази розвитку клітин і процеси біосинтезу.

Існують технології вирощування водоростей у малих біореакторах, розташованих поблизу електростанцій. Тепло, яке вивільнюють ТЕЦ, здатне покрити до 77 % потреб у ньому для вирощування водоростей.

Терміном “фотобіореактор” позначають апарати, в яких здійснюють культивування фотосинтезуючих мікроорганізмів.

Фотобіореактори закритого типу були створені на протипагу відкритим ємностям або ставкам, в яких переважно культивують мікробіодорості в промислових умовах, часто навіть без додаткової аерації і перемішування. За таких умов вихід цільового продукту в декілька разів нижчий, ніж при інтенсивному культивуванні в контрольованих умовах фотобіореактора. Фотобіореактори працюють або 1) у режимі накопичення (один виробничий цикл), або 2) у режимі накопичення з підживленням, або 3) у режимі неперервного культивування. Найчастіше неперервне культивування мікробіодоростей проводять у турбідостаті – фотобіореакторі, де підтримується задана густина суспензії мікробіодоростей за рахунок періодичного видалення мікробіодоростей і додавання живильного розчину.

Конструктивно біореактори є досить складними інженерними системами. Забезпечення оптимальних умов для росту мікробіодоростей вимагає постійного контролю і підтримання на певному рівні цілого ряду параметрів і умов асептики, температурного режиму, рН, окисно-відновного потенціалу середовища, концентрації розчиненого кисню, забезпеченості вуглекислотою та основними поживними речовинами, швидкості руху рідини, інтенсивності перемішування. Принципові риси конструкцій і режими культивування були напрацьовані

при розробках лабораторних реакторів і промислових ферментерів, вимоги до яких здебільшого співпадають з вимогами до фотобіореакторів, але основна увага при конструюванні фотобіореакторів приділялася забезпеченню культур світлом, що накладає принципові обмеження на їх конструкцію.

4.2. Забезпечення світлом фотосинтетичного апарату мікрободоростей у процесі культивування

Швидкість фотосинтезу залежить від інтенсивності діючого світла, так, як швидкість росту культури мікроорганізмів залежить від наявності відповідного субстрату. У цьому сенсі світлова крива фотосинтезу (рис. 4.1), тобто залежність фотосинтетичного виділення кисню або поглинання CO_2 від інтенсивності діючого світла є типовою кривою росту. Спочатку при підвищенні інтенсивності діючого світла швидкість фотосинтезу значно зростає, і нахил світлової кривої є найвищим. При подальшому зростанні освітленості швидкість фотосинтезу починає зменшуватись, указуючи на поступове насичення процесу. Коли зростання інтенсивності світла не призводить до змін швидкості фотосинтезу, усі клітини водоростей знаходяться в стані повного світлового насичення. Нарешті, настає момент, коли при зростанні інтенсивності світла відбувається зниження швидкості процесу, тобто спостерігається світлове інгібування фотосинтезу. Світловим інгібуванням або фотоінгібуванням називають явище, яке відображає фотоінактивацію фотосинтетичного апарату – пригнічення фотосинтетичних функцій. Відповідні інтенсивності світла (щільність

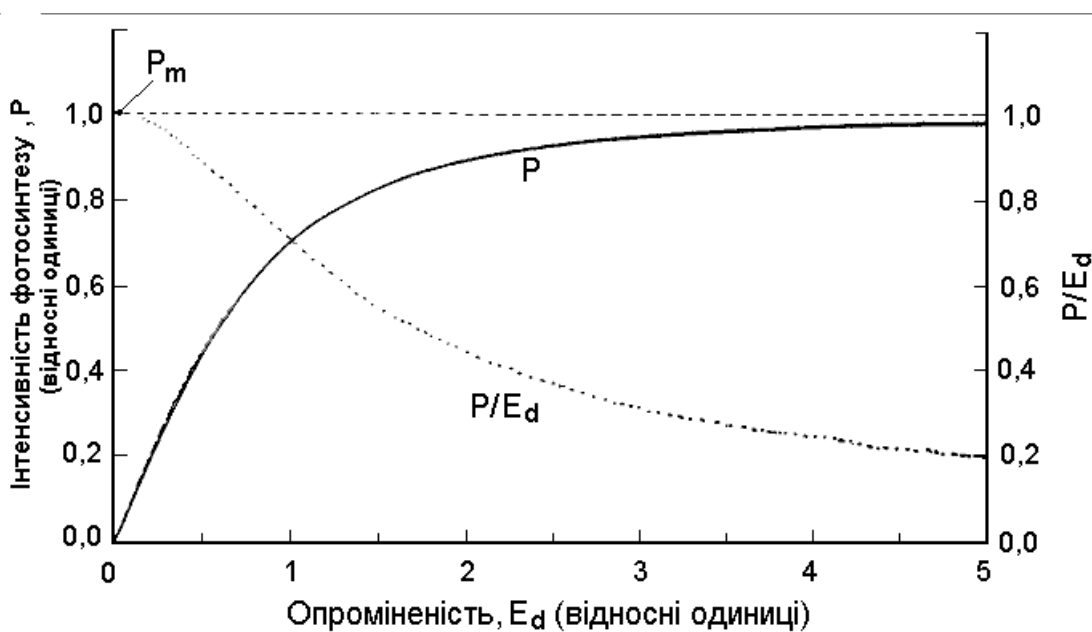


Рис. 4.1. Світлова крива фотосинтезу.

поток фотонів, ЩПФ) отримали назви “насичуюче світло”, коли спостерігається насичення фотосинтезу, і “інгібуюче світло”, коли спостерігається зниження швидкості цього процесу. Низькій інтенсивності світла відповідає ЩПФ 100-300 мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, а високій інтенсивності світла – ЩПФ 900-1200 мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$.

Для максимальної продуктивності мікроводоростей зона світлового насичення повинна бути рівномірно розповсюджена по всьому об’єму фотобіореактора, що загалом неможливо зробити в умовах масштабного культивування. Застосування перемішування забезпечує циркуляцію клітин водоростей між зонами, знижуючи ефект фотоінгібування на освітленій поверхні та втрату біомаси в зоні темряви. Однак реально цим способом досягають певних умов, за яких відносні частки зони фотоінгібування і темряви є малими. Ефективним може бути застосування високої інтенсивності світла при оптимальній густині мікроводоростей у комбінації з відповідно підібраним часом циркуляції рідини.

У фотобіореакторах завжди існує градієнт освітленості, обумовлений поглинанням світла і взаємного затінення клітин. Світловий режим у реакторі визначається світловим градієнтом і швидкістю циркуляції рідини. У залежності від гідродинамічних характеристик системи клітини циркулюють між освітленими і затіненими частинами реактора. Доведено, що тривалість циклів світло – темрява визначають світлову ефективність і продуктивність фотобіореактора. Швидкий перехід мікроводоростей між високою інтенсивністю світла і темрявою (від 40 мкс до 1 с) може суттєво підвищити фотосинтетичну ефективність і тим сильніше, чим коротший перебіг часу.

Згідно зі світловою кривою фотосинтезу, фотосинтетична ефективність (P/E_d – відсоток акумульованої хімічної енергії відносно падаючої світлової енергії) є найвищою при дуже низькій інтенсивності світла і знижується зі зростанням інтенсивності діючого світла (рис. 4.1). Однак, така відповідь мікроводоростей на світловий фактор спостерігається тільки для оптично тонкого шару, тобто коли немає значного самозатінення клітин. Така ситуація ніколи не спостерігається при культивуванні мікроводоростей.

Світлова енергія постачається в реактор крізь прозорі поверхні і її інтенсивність різко, експоненційно, спадає при віддаленні від освітлюваної поверхні вглиб реактора. Оцінити інтенсивність світла, яке проникає в суспензію мікроводоростей (I), можна за допомогою закону Бугера-Ламберта-Бера:

$$I = I_0 \exp(-a(\lambda)l), \quad (4.1)$$

$$a(\lambda) = [k(\lambda) + m(\lambda)C], \quad (4.2)$$

де $k(\lambda)$ – лінійний коефіцієнт поглинання води [см^{-1}],

$m(\lambda)$ – масовий коефіцієнт поглинання (переріз поглинання на одиницю маси

мікроводоростей) [$\text{м}^2 \text{кг}^{-1}$],

l – відстань від освітлюваної поверхні реактора, м.

Поглинанням води (живильного середовища) можна знехтувати.

Класична форма закону Бугера-Ламберта-Бера строго виконується лише для світла, що розповсюджується в одному напрямку.

У межах об'єму біореактора одночасно можна виділити кілька ділянок з різною інтенсивністю світла, а саме: повної темряви, світлового лімітування, світлового насичення, світлового інгібування. Зони повної темряви і фотоінгібування є несприятливими ділянками культиватора для росту водоростей. Інтенсивність падаючого світла, що завжди використовується як показник забезпечення світлом, мало характеризує справжні світлові умови у фотобіореакторі. Кращою характеристикою світлових умов у реакторі є середня інтенсивність світла. Концепція середньої інтенсивності світла базується на припущенні, що клітини мікроводоростей при перемішуванні суспензії протягом короткотривалого часу перебувають у різних світлових умовах, що еквівалентно постійному перебуванню в умовах середньої інтенсивності світла.

Для створення сприятливих умов освітлення у фотобіореакторі потрібно максимально збільшити відношення освітлюваної поверхні фотобіореактора до його об'єму (S/V). Співвідношення (S/V) є одним з найбільш загальних параметрів, які характеризують фотобіореактор. Проте перехід від лабораторних установок до промислових, так зване масштабування, викликає великі труднощі. Часто просте масштабування неможливе за технічних причин, або у зв'язку з суттєвим погіршенням характеристик реактора, який збільшився порівняно з лабораторним. Тому при розробці промислових культиваторів необхідно застосовувати інші конструктивно-технологічні рішення.

Основною вимогою до конструкції фотобіореактора є ефективний розподіл світла всередині культур, який може бути здійснений тільки через вирішення низки специфічних проблем.

Головною з них є достатність і рівномірність освітлення по всьому об'єму культури, що не може бути досягнуто при культивуванні водоростей у резервуарах без перемішування. У басейні або ставку світло в кількості, яка насичує фотосинтез, проникає лише на глибину кількох сантиметрів від поверхні. У прозорому резервуарі освітленість може бути достатньою лише біля стінок або поверхні, а в глибину резервуара світлова енергія в необхідній кількості не може проникнути. У зв'язку з цим фотосинтез мікроводоростей припиняється. Згідно з вимірюваннями А.А. Циганкова (2001), при концентрації клітин *Anabaena variabilis* усього лише 0,6 г сухої біомаси / л суспензії шар культури товщиною 1 см поглинає 90 % світлового потоку, і лише 1 % світла досягає глибини 2 см. При більшій

концентрації біомаси загасання світлового потоку відбувається ще швидше. Це добре видно з результатів вимірювання падіння щільності потоку фотонів при заглибленні в суспензію культури одноклітинної зеленої водорості *Euglena gracilis* (рис. 4.2). Таким чином, обмежена продуктивність водоростей визначається самою природою резервуару і низьким співвідношенням освітленої і неосвітленої областей, обумовленим експоненціальним зниженням світлового потоку по мірі його проходження крізь оптично поглинаюче середовище. Саме тому перші спроби використання для вирощування мікроводоростей звичайних ємностей зі значною (більше 5 см) товщиною шару суспензії призводили до дуже низьких виходів їх біомаси.

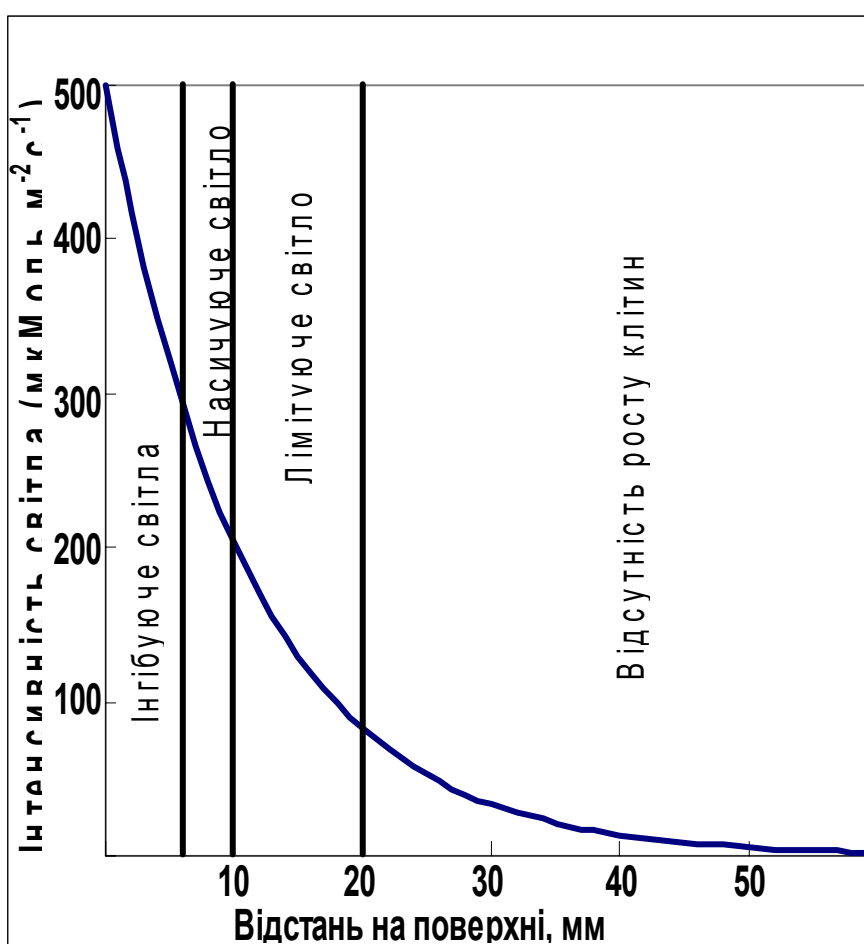


Рис. 4.2. Розподіл світла всередині фотобіореактора, який містить 1 г/л клітин *Euglena gracilis*, з коефіцієнтом поглинання $200 \text{ м}^2 \text{ кг}^{-1}$.

Освітлення фотобіореактора з одного боку світлом із щільністю потоку фотонів $500 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$.

Проблема загострюється, якщо резервуар освітлюють дуже інтенсивним світлом, тому що ріст водоростей у пристінних шарах буде пригнічений через фотоінгібування культур, а в

глибині – через нестачу світла. При перемішуванні яскраво освітленої суспензії мікроводоростей треба враховувати також необхідність адаптації культур до рівня освітлення. Пігментний апарат фотосинтезуючої клітини перебудовується при зміні інтенсивності освітлення, і культура, адаптована до яскравого світла, є менш продуктивною при зниженні освітлення, ніж культура, адаптована до низької освітленості, і навпаки. Тому при перемішуванні товстого шару суспензії мікроводоростей клітини по чергово із затіненого середовища будуть потрапляти на яскраве світло, що негативно позначиться на їх продуктивності.

Ще однією проблемою, яку слід обов'язково враховувати при створенні фотобіореакторів, є обростання внутрішніх поверхонь реактора мікроводоростями, що призводить до зниження інтенсивності освітлення глибинних шарів культури і зменшення її продуктивності. Для підтримки реактора в робочому стані стінки потрібно періодично очищувати, або застосовувати спеціальні засоби запобігання обростанню.

За відсутності перемішування суспензії мікроводоростей концентрація вуглекислоти в її товщі швидко падає через фіксацію CO_2 в процесі фотосинтезу. Звичайна дифузія CO_2 з повітря лише частково компенсує світлозалежне поглинання водоростями вуглекислоти. Тому, для забезпечення фотосинтезу необхідно постійно збагачувати нею суспензію шляхом активного перемішування або барботування повітрям. Вміст вуглекислого газу в повітрі не є достатнім для насичення фотосинтезу. Він складає біля 340 ppm (0,034 %), і незалежно від рівня освітлення підвищення вмісту вуглекислого газу в повітрі до 1 % призводить до зростання швидкості фотосинтезу в 1,5 рази. Обладнання фотобіореакторів передбачає наявність системи газообміну і подачу в об'єм культурального середовища газової суміші (повітря, збагаченого CO_2). Подача газу в реактор забезпечує перемішування суспензії.

4.3. Конструкції існуючих фотореакторів для вирощування мікроводоростей

4.3.1. Бульбашкові та газліфтні фотобіореактори

За способом перемішування водного середовища біореактора газом, що надходить, виділяють бульбашкові і газліфтні (аерліфтні) фотобіореактори. Від ефективності перемішування залежить величина періоду циркуляції рідини в об'ємі реактора, яка визначається як середня тривалість циклів світло – темрява для кожної клітини. Для бульбашкових реакторів ця величина складає 1-4 с, а для аерліфтних – 10-100 с.

Оскільки барботування повітряно-газовою сумішшю поряд з перемішуванням повинно забезпечити підживлення культури вуглекислотою, для підвищення поверхні бульбашок їх розмір повинен бути досить малим. Для цього газ пропускають крізь перфоровані пластини, кільця, трубки, спеціальні наконечники з насадками. При цьому слід підбирати діаметр отвору і відстань між отворами таким чином, щоб об'єм бульбашок, які утворюються при виході газу, зберігався, і вони не зливалися у великі бульбашки. Інакше поверхня розділу між газової фазою і рідиною не буде достатньою для забезпечення ефективної дифузії вуглекислоти в розчин. Бульбашкові колонії широко використовуються в біотехнологічній промисловості завдяки ряду переваг, серед яких можна відмітити високі швидкості тепло- і масопередачі, відсутність рухомих частин, конструктивну простоту, низькі витрати на обслуговування і підтримання (Kantarci et al., 2005).

В аерліфтних конструкціях газ подається в нижню частину колоноподібного резервуару, обладнаного тяговою трубою, власне ліфтом (внутрішньою трубою) або іншим пристроєм (зовнішньою тяговою трубою). При цьому об'єм біореактора розподіляється на зону, де є газ, і на зону, вільну від газу, у результаті чого створюється вертикальний циркуляційний потік суспензії (рис. 4.3).

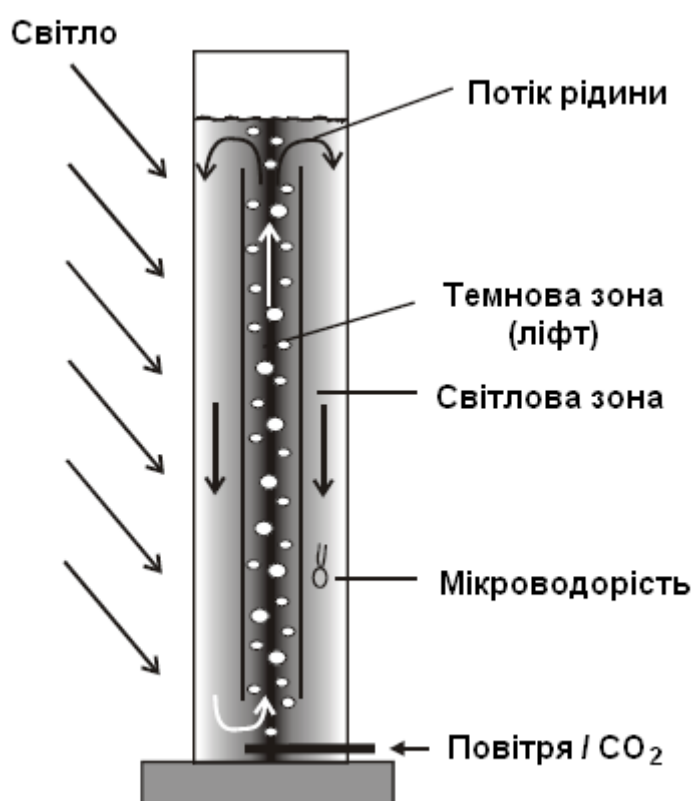


Рис. 4.3. Аерліфтний реактор.

У бульбашкових реакторів, на відміну від аерліфтних, відсутня тягова труба, що дещо знижує ефективність перемішування.

4.3.2. Шляхи модернізації фотобіореакторів

Для створення фотобіореакторів часто використовують наявні в продажу ферментери. У цьому випадку можливе застосування звичайних, добре відпрацьованих прийомів стерилізації, інокуляції, відбору проб і т.п. Це особливо актуально при вирощуванні культур з додаванням екзогенно органічних речовин, тобто у фотогетеротрофних умовах. Проте через складність вирішення проблеми ефективного постачання світла спроби створити фотобіореактори на основі звичайних ферментерів зі спеціальною організацією простору для суспензії культур мікроводоростей не завжди були вдалимими. Так, наприкінці 70-х рр. XX-го сторіччя фірма “New Brunswick Scientific Co.” запропонувала модифікацію свого ферментера для культивування фототрофних мікроорганізмів шляхом додаткового введення джерел випромінювання безпосередньо всередину ферментера. Однак за таких умов освітлення вихід біомаси був дуже низьким. Очевидно, що для збільшення продуктивності біореакторів потрібно вдосконалити конструкцію звичайних ферментерів і впровадити рішення по спеціальній організації освітлення культури.

Цікаве рішення запропонував В.А. Жаворонков зі співавторами (1986). Світло в описаній конструкції вводилося в отвір разом з газовою сумішшю. Газовий факел, що утворювався, ефективно розсіював світло за рахунок його заломлення газовими бульбашками.

Ідея введення джерела світла всередину культиватора використовувалася дослідниками неодноразово. Є декілька розробок фотобіореакторів на основі модифікації ферментера фірми “Marubishi” (Японія) загального об’єму 1,6 л, (робочий об’єм – 1,2 л, а товщина шару суспензії – 25 мм). Джерело світла вводили всередину ферментера по його осі. Для запобігання перегріву середовища між джерелом світла і культурою поміщали водяний фільтр, який розташовували вище перемішуючого пристрою. Датчики вводили крізь кришку реактора, перемішували стандартною мішалкою. До переваг цього типу фотобіореакторів слід віднести простоту конструкції, повне збереження всіх особливостей ферментера, які дозволяють користуватися звичайними мікробіологічними методами посіву, відбору проб і т. ін. З недоліків слід зазначити деяку неоднорідність товщини шару суспензії мікроводоростей, що утруднює обчислення середньої інтенсивності світла всередині.

Існує фотобіореактор, створений на основі ферментера Ак10, СКБ БП (Пушино), обладнаний розташованим на осі піногасником і порожнистим барабаном з нержавіючої

сталі, який виконує роль перемішуючого пристрою і одночасно знижує товщу освітлюваного шару. Реактор освітлюється двома зовнішніми лампами, розташованими по його діаметру. Датчики (рН, температури та ін.) знаходяться в окремій комірці, яка включена в контур рециркуляції. Культуру поміщають у простір між скляним циліндром і барабаном. Газова фаза подається звичайним для Ак10 способом. Такий простий підхід дозволив перетворити ферментер на фотобіореактор при зниженні його робочого об'єму з 10 до 3 л з одночасним зменшенням товщини освітлюваного шару. До недоліків слід віднести відсутність теплового екрану між джерелом освітлення і культурою, що може призводити до локального перегріву культури, необхідність контуру рециркуляції для введення датчиків, а також нерівномірність освітлення двома зовнішніми лампами.

4.3.3. Плоскопаралельні фотобіореактори

Останнім часом зросла пропозиція комерційних фотобіореакторів, створених спеціально для промислового вирощування мікроводоростей. Вони побудовані з використанням розроблених раніше принципів і конструктивно відносяться до одного з трьох типів. Це фотобіореактори у вигляді плоскопаралельних кювет; трубчасті реактори; фотобіореактори на основі коаксіальних циліндрів, у яких культура знаходиться в кільцевому проміжку між двома співвісно встановленими прозорими циліндрами.

Найпростішими конструкціями є плоскопаралельні фотобіореактори. У реакторах цього типу культура мікроводоростей знаходиться всередині прозорої кювети невеликої товщини (від 0,1 до 2 см), яка освітлюється зовнішнім джерелом і перемішується газовою сумішшю, що подається знизу. Така проста конструкція дозволяє загалом задовільно вирішити питання рівномірного освітлення, яке насичує фотосинтез. Джерело освітлення може бути встановлене як з одного, так і з двох боків кювети. У разі двобічного освітлення продуктивність культури зростає вдвічі. Кількість світла, що подається на одиницю об'єму, залежить від товщини кювети. Проте при використанні природного освітлення для кожної культури існує оптимальна товщина, обумовлена компромісом між пригніченням глибинних шарів через нестачу світла і інгібуванням поверхневого шару культур світлом надмірної інтенсивності. Цей реактор, незважаючи на простоту, виявився особливо корисним при вивченні фізіологічних особливостей одноклітинних мікроводоростей, ціанобактерій і пурпурних бактерій і дозволив визначити основні енергетичні характеристики росту фототрофних мікроорганізмів.

На жаль, ця конструкція реактора має ряд недоліків. Газомасообмін у ньому зростає зі збільшенням швидкості подачі газової суміші тільки до певної межі. При дуже високій

швидкості її подачі в об'ємі утворюються великі порожнини, і газ виходить практично без перемішування з культуральною суспензією. Для пригнічення піноутворення доводиться встановлювати зовнішній механічний піногасник, в якому скупчується значна кількість культури, яка не отримує світла і не бере участь у фотосинтезі. При великій витраті газу утруднена підтримка постійного об'єму суспензії, що значно ускладнює процес безперервного культивування. Зовнішнє джерело світла робить фотобіореактор громіздким, причому не завжди, навіть при лабораторних розмірах (до 1 м²), вдається досягти рівномірного освітлення культури. Крім того, він виявився придатним не для всіх типів мікроводоростей, а для таких, які схильні до утворення осаду або створюють плівку на стінках реактора, ростуть переважно на стінках або на дні посудини. Механічне перемішування в такому реакторі неможливе через малу товщину шару суспензії. Конструктивні особливості плоскопаралельних реакторів не дозволяють проводити стерилізацію автоклавуванням або текучою парою, тому він непридатний при вирощуванні культур з додаванням органічних сполук, таких як цукри або ростові речовини.

Л.Н. Цоглін зі співавторами (1996) запропонували конструкцію реактора, яку назвали “Прибой”. У такому реакторі плоскопаралельна кювета заповнюється приблизно на 60-90 % і стоїть на великій площині, а рідина рухається вздовж горизонтальної осі, що проходить крізь середину нижньої площини. Культура всередині резервуара погойдуеться в кюветі у вигляді хвилі. Це забезпечує хороший газообмін при ефективному постачанні світла до всього об'єму культури. Незважаючи на простоту конструкції і оригінальний економічний спосіб перемішування, що перешкоджає обростанню внутрішніх поверхонь, даний реактор не може бути використаний для безперервного культивування через невизначений об'єм культури в реакторі. Крім того, інструментальний контроль культуральної суспензії утруднений, оскільки використаний спосіб перемішування не забезпечує гомогенності суспензії всередині реактора. Проте ця конструкція зручна при масштабуванні процесу і недорога у виробництві, що дозволяє використовувати її для нарощування біомаси. Кювети плоских фотобіореакторів можуть бути розташовані горизонтально, вертикально або похило.

4.3.4. Трубчасті фотобіореактори

Надзвичайно ефективною системою для високопродуктивного культивування багатьох мікроводоростей виявилися трубчасті реактори, які поділяють на горизонтальні, вертикальні та спіральні. Загальною рисою трубчастих систем є наявність двох модулів: світлового і газомасообмінного. Фотосинтез переважно відбувається в системі прозорих трубок, які з'єднані з газомасообмінним резервуаром, і суспензія мікроводоростей постійно циркулює

від резервуару по прозорих трубках і назад до газомасообмінника. Свіже живильне середовище і газова суміш надходять у газомасообмінник і звідти, завдяки насосам, у трубчасту частину реактора. Перемішування суспензії в масообміннику здійснюється шляхом продування газу, який надходить у резервуар, крізь отвір, розташований під ним. При додаванні свіжого живильного середовища в резервуар рівень рідини в ньому підвищується, і порція суспензії мікробудоворостей відбирається крізь верхній патрубок для подальшої переробки. Таким чином, система функціонує в безперервному режимі (рис. 4.4).

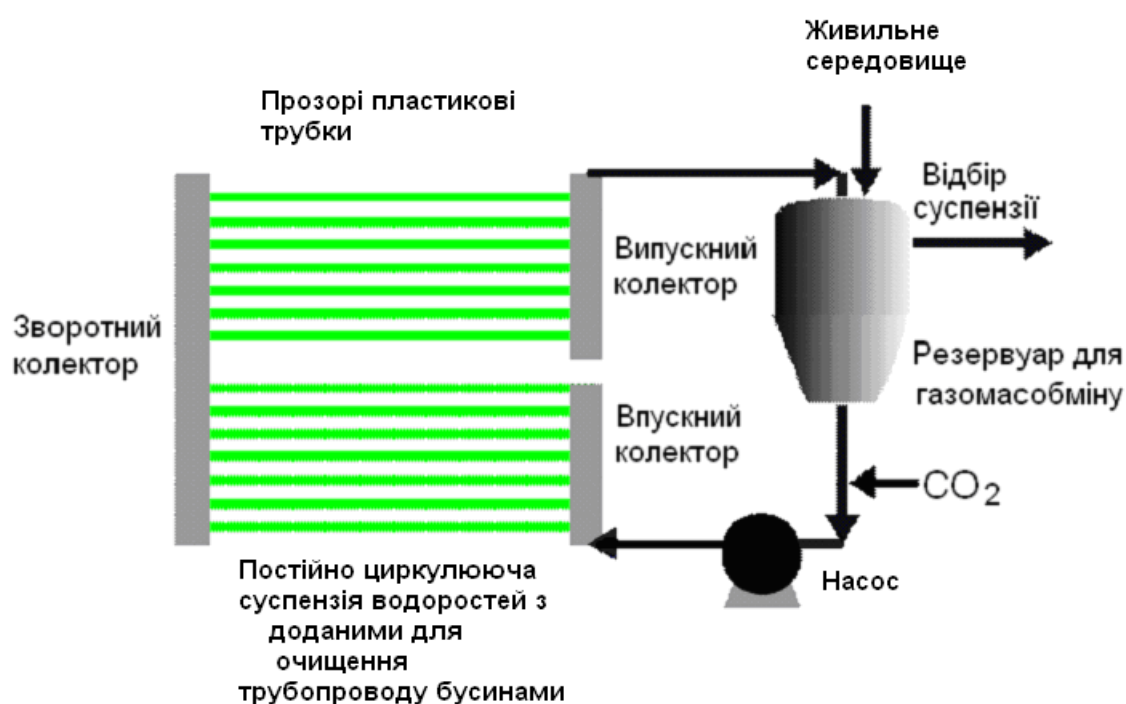


Рис. 4.4. Схема трубчастого фотобіореактора. У разі приведення культури в рух за допомогою насоса газова суміш подається безпосередньо в газомасообмінник.

У трубчастих реакторах проблема світлопостачання вирішується завдяки невеликому діаметру трубок, в яких культура мікробудоворостей може бути добре освітлена навіть у центрі (рис. 4.5). Це максимізує зовнішню область, доступну для фотосинтезу. Наявність резервуара для газомасообміну дозволяє культурі мікробудоворостей періодично перебувати в темряві, що є важливим для здійснення темнових метаболічних процесів.

Запропоновано багато різних варіантів трубчастих реакторів, але в основному всі вони працюють за єдиним принципом. У наш час трубчасті біореактори виготовляють з прозорих полівінілхлоридних і фторопластних трубок, що дозволяє надавати конструкції різних форм.

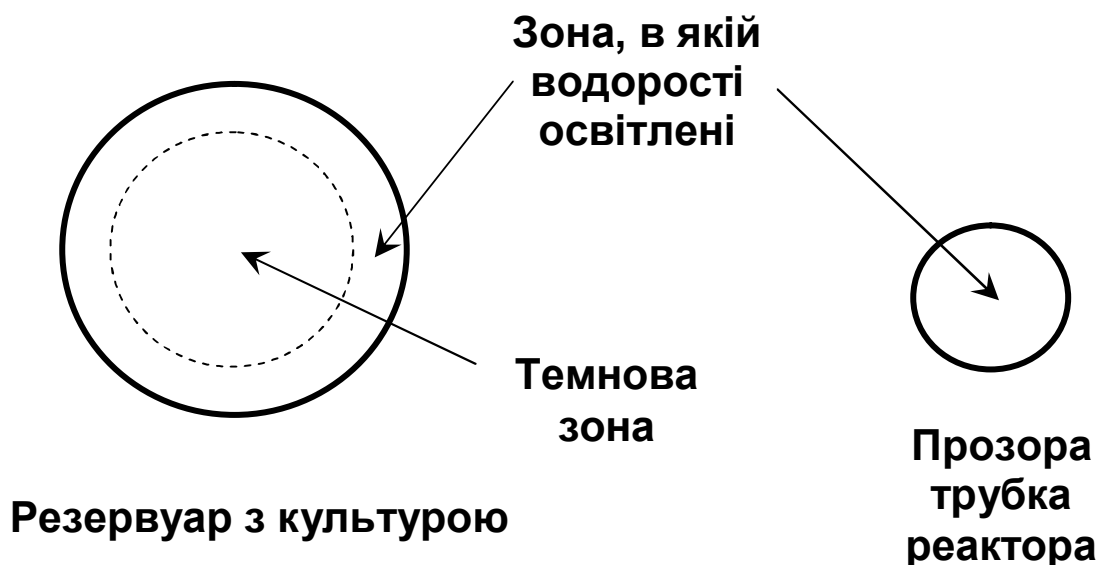


Рис. 4.5. Розподіл світла в різних частинах трубчастого фотобіореактора.

Наприклад, якщо обирають гнучкі пластикові прозорі трубки, то реактор може мати форму циліндра, зрізаного конуса, що стоїть на основі або на вершині, можуть бути у формі змійовика або згорнуті в кільце. Якщо трубки жорсткі, їх з'єднують спеціальними муфтами в трубопровід. У разі циліндричної форми реактора з'являється можливість ввести джерело світла всередину циліндра, і таким чином зробити конструкцію більш компактною при значному спрощенні системи розподілу світла. Розроблені реактори з вбудованими джерелами світла як без перемішуючого пристрою, так і з перемішуючим пристроєм, якому надає рух газ, що виходить, або звичайна мішалка пропелерного типу. Загальним недоліком таких реакторів є недостатня турбулентність перемішування в їх верхній частині, унаслідок чого відбувається заростання стінок реактора культурою.

Процес безперервного культивування організують шляхом одночасного відбору частини суспензії мікроводоростей і додавання рівного об'єму свіжого живильного середовища. Для цього трубку для відведення надлишку газу занурюють у газомасообмінник на рівень, на якому бажано підтримувати суспензію мікроводоростей. При подачі середовища рівень суспензії в газомасообміннику зростає, і надлишок суспензії виводиться разом з потоком газу. Якщо надлишок суспензії відбирається прямо з поверхні рідини в газомасообміннику, можливе часткове фракціонування культури, оскільки при гетерогенній популяції на поверхні суспензії переважають дрібні форми мікроводоростей. Для запобігання фракціонуванню закінчення трубки роблять у формі трійника, нижній кінець якого занурений у суспензію мікроводоростей, а верхній сполучений з газовою фазою. Якщо

рівень рідини досягає основи трійника, вона перекриває вихід газу і, таким чином, надлишок суспензії, відібраний з глибини газомасообмінника, виходить з резервуару.

Трубчастий реактор виявився зручним при лабораторному відпрацюванні регламентів культивування, а дані, отримані в лабораторії, можна екстраполювати на промисловий реактор такої ж конструкції. Проте і цей тип реактора не позбавлений недоліків, основним з яких є просторове розділення процесу фотосинтезу і газомасообміну (фотосинтез здійснюється всередині освітлюваної трубки, тоді як газообмін відбувається в газообміннику і в разі газліфтного способу перемішування – у висхідній частині трубки). Таким чином, певна фракція культури знаходиться поза освітленою частиною, де фотосинтез не відбувається. Результатом цього є просторова неоднорідність не тільки світлового режиму, але й інших параметрів процесу культивування. Культура на виході з газомасообмінника збагачена газовим субстратом (вуглекислотою і молекулярним азотом), у ній немає надлишку кисню (у разі культивування мікроводоростей і ціанобактерій). По мірі проходження по петлі освітленої трубки в процесі фотосинтезу відбувається поглинання вуглекислоти і виділення кисню. При цьому змінюються рН і окисно-відновний потенціал середовища. У разі повільного руху суспензії або при зайвій довжині світлової частини фотобіореактора вміст кисню може досягати інгібуючих концентрацій, а вуглекислота може стати фактором, який лімітує ріст.

Культивування мікроводоростей у трубчастих реакторах має суттєву перевагу внаслідок можливості масштабування процесу і простоти виготовлення. Вони складаються з прозорої трубки невеликого діаметру (до 1,6 см для лабораторних і до 5 см для промислових реакторів) і газомасообмінника, з'єднаних послідовно (рис. 4.6). Культура приводиться в рух усередині контуру за допомогою аерліфта або насоса. Прозора трубка освітлюється зовнішнім джерелом світла. У конструкціях, де використовувалися переважно скляні трубки, їх збирали у вигляді панелей із щільним розташуванням трубок одна до одної.

Наслідком просторової неоднорідності є те, що кожна окремо взята клітина культури піддається постійним коливанням ряду чинників середовища (рН, pO_2 , CO_2 , інтенсивність світла і т. ін.) в часі, що утруднює визначення ролі цих показників у метаболізмі.

Амплітуда коливань указаних чинників визначається концентрацією клітин (X), питомою швидкістю їх фотосинтезу (Φ) і часом знаходження у світловій частині реактора (t):

$$C_{\text{макс}} - C_{\text{мін}} = kX\Phi t \quad (4.3),$$

де k – коефіцієнт пропорційності (для концентрації кисню та вуглекислоти k практично дорівнює 1).

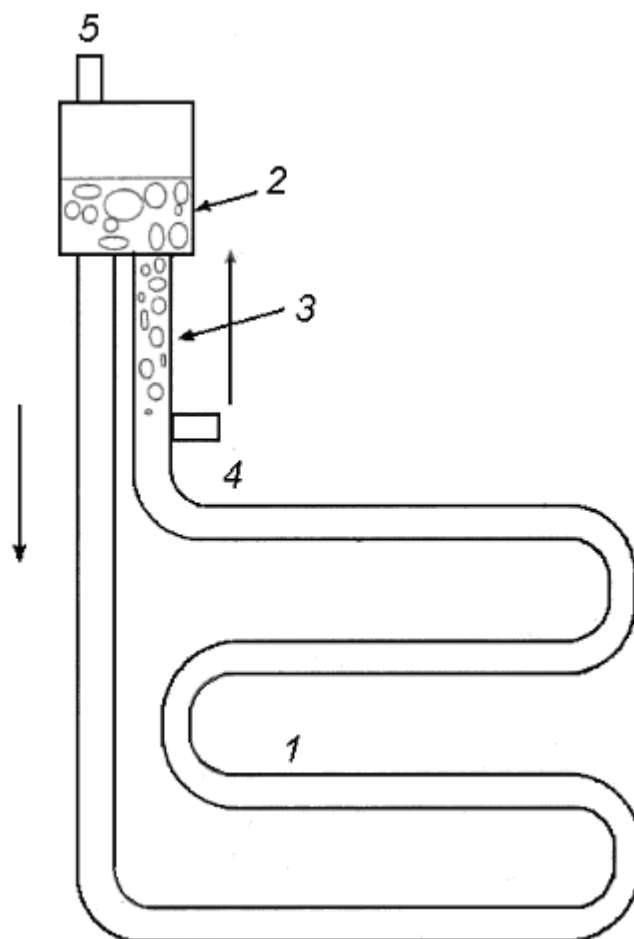


Рис. 4.6. Схема трубчастого фотобіореактора.

У випадку надання культурі руху за допомогою насоса газова суміш подається безпосередньо в газомасообмінник.

1 – освітлювана частина фотобіореактора; 2 – газомасообмінник; 3 – аерліфт;
4 – вхід газу; 5 – вихід газу.

Стрілками вказаний напрямок руху культури.

Розвинена освітлена поверхня трубчастих реакторів зазнає обростання, внаслідок якого зменшується світловий потік, що падає на культуру, і значно знижується продуктивність процесу культивування. А.А. Штоль зі співавторами (1976) розраховали, що утворення плівки з клітин мікроводоростей гальмується, якщо лінійна швидкість руху рідини становить не менше 1-2 м/с, в той час як реальна лінійна швидкість руху суспензії в аерліфтних реакторах не перевищує 0,15-0,35 м/с. Таким чином, обростання стінок реактора плівкою мікроводоростей неминуче, і для боротьби з ним необхідні спеціальні заходи. Шар мікроводоростей, які осіли на стінках, можна зняти безпосередньо в процесі культивування, пропустивши крізь реактор поролоновий пиж, виконаний у вигляді кульки з діаметром, який на 1-10 % більший за внутрішній діаметр трубки. Проте введення пижів утруднює

інструментальний контроль процесу і завдає додаткових труднощів підтриманню чистоти вирощуваної культури. Більше того, не всі конструкції реакторів дозволяють здійснювати механічне очищення внутрішніх поверхонь. Так, у трубчастих реакторах з паралельним з'єднанням світлоприймальних елементів (рис. 4.7) використання піжа неможливе, оскільки він зупинить рух суспензії клітин у тому світлоприймальному елементі, в який потрапить, що призведе до застою культури та її загибелі.

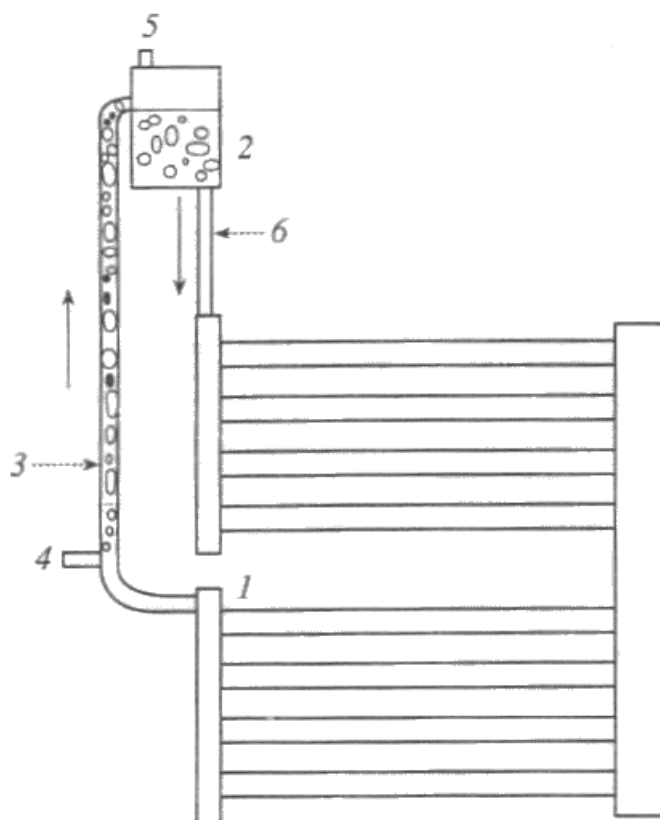


Рис. 4.7. Схема масштабування трубчастого фотобіореактора шляхом паралельного установлення світлоприймальних трубок.

1 – освітлювана частина фотобіореактора; 2 – газомасообмінник; 3 – аерліфт; 4 – вхід газу; 5 – вихід газу; 6 – низхідна вітка.

Стрілками вказаний напрямок руху культури.

Використання нових матеріалів дозволяє значно спростити конструювання трубчастого реактора. Зокрема, фірма “Rohm” (Німеччина) випускає прозорі секційні панелі з макролону, акрифіксу і плексигласу. Секції з'єднуються послідовно, і їх підключення в контур з газомасообмінником дає можливість сконструювати трубчастий реактор, в якому секції панелі відіграють роль трубок. Реактор, побудований на основі таких панелей, зовнішньо виглядає як пласкопаралельна кювета, проте конструктивно він організований подібно до

петльових реакторів. Його масштабування можливе шляхом послідовного або паралельного з'єднання секцій. Показано, що для масштабування найефективнішим є послідовне з'єднання секцій всередині панелі з оптимальним вибором розміру панелі і паралельне з'єднання самих панелей.

Останнім часом у зв'язку зі зростанням попиту на апаратуру промислового вирощування мікроводоростей на ринку з'явився багатий асортимент фотобіореакторів і обладнання до них. Як правило, сучасні комерційні реактори є трубчастими і вироблені з міцних, прозорих, стійких до ультрафіолету трубок. Спосіб розташування, система очищення трубопроводу від обростання, збирання врожаю і системи контролю за процесом, як правило, дещо відрізняються в реакторів різних фірм. Найбільш потужну рекламну компанію останнім часом веде голландська фірма BioKing, яка позиціонує себе як світовий лідер у виробництві фотобіореакторів і пропонує системи від невеликої відносно дешевої простої установки об'ємом 2,5 л до промислового реактора AlgaeLink® продуктивністю 100 т сухої біомаси за день (рис. 4.8).

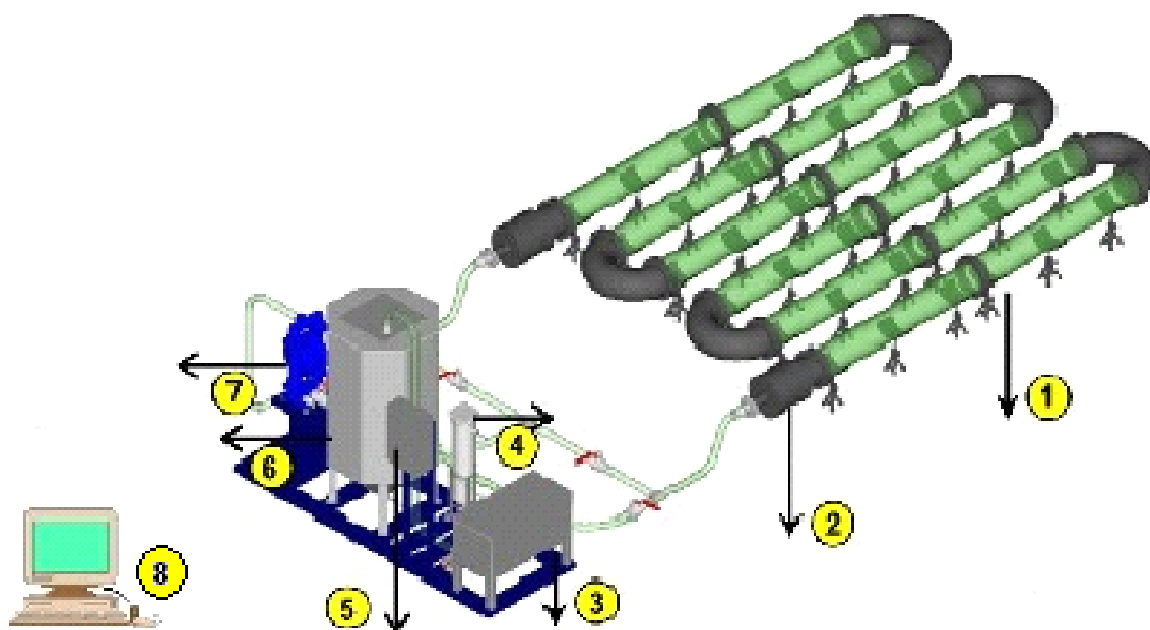


Рис. 4.8. Схема фотобіореактора AlgaeLink®:

1 – світлова частина трубчастого фотобіореактора; 2 – запатентована автоматична система очищення; 3 – насоси; 4 – система фільтрування; 4 – комп'ютерний блок контролю і керування; 6 – масообмінник; 7 – насос для подання суспензії в реактор; 8 – комп'ютери.

Трубки фотобіореактора AlgaeLink® змонтовані в горизонтальній площині у вигляді змійовика. Для реактора продуктивністю 1 т за день діаметр труб складає 630 мм, загальна довжина – 1 605 м. Реактор розташовується на площі 5 347 м².

Ключовими перевагами біореактора AlgaeLink® вважаються наступні:

- конструкція забезпечує максимальну ефективність у використанні світла, і, як наслідок, високу продуктивність. Зазвичай вона в 10-20 разів перевищує продуктивність водоростей при неоптимізованому вирощуванні;
- збереження простору. Реактор може бути змонтований як у приміщенні, так і під відкритим небом;
- низька вартість транспортування в зв'язку з тим, що трубчасті деталі реактора виготовляються на місці з листів пластику за патентованою технологією;
- різко зменшені трудові затрати на монтаж реактора;
- робочий стан системи зберігається протягом тривалого часу без руйнування культури;
- запатентована система самоочищення реактора різко знижує його забруднення;
- закрита, замкнена, повністю автоматизована конструкція реактора дозволяє підтримувати чистоту культури при повному контролі екологічних параметрів режиму культивування;
- кисень, що отруює, не може накопичуватися, оскільки задіяна система автоматичного поглинання кисню;
- конструкція реактора стимулює швидкий ріст мікроводоростей;
- передбачено масштабування конструкції до будь-якого розміру;
- реактор повністю автоматизований і технологічний режим контролюється ЕОМ;
- збирання мікроводоростей здійснюється кожні 3,5 години вмикання фільтруючого модуля, тому суспензія водоростей залишається прозорою протягом усього технологічного циклу.

Разом з цим можна зауважити, що розташування трубчастої частини реактора в горизонтальній площині призводить до того, що нижня частина трубок не освітлена, а їх діаметр 0,63 м, очевидно, занадто великий, щоб забезпечити належну освітленість усього об'єму культури.

Слід відмітити, що час перебування культури в світловій частині такого реактора визначається лінійною швидкістю руху культуральної рідини і довжиною трубки. Таким чином, цей тип реактора має природні обмеження на масштабування процесу шляхом простого збільшення довжини освітлюваної трубки. Знаючи питому швидкість фотосинтезу культури і максимальну швидкість руху рідини, на підставі рівняння (4.3) можна

розрахувати максимальну довжину світлової частини реактора, при якій не відбуватиметься обмеження або інгібування росту культури субстратом або продуктом.

Подальше масштабування процесу культивування без втрати питомої продуктивності вимагає спеціальної організації газомасообмінної і фотосинтетичної частини даного типу реакторів. Наприклад, подальше збільшення об'єму реактора при максимальній довжині трубопроводу можливе за рахунок збільшення кількості паралельно включених світлоприймальних трубок (Richmond, 2000). Таке рішення було використане при створенні фотобіореактора фірмою BioFence. Світлова частина реактора монтується з 5-метрових прозорих пластикових трубок, які з'єднуються одним кінцем із впускним, або з випускним, а іншим – зі зворотним непрозорим пластиковим колектором. Впускний і випускний колектор мають по 8 отворів для з'єднання, а зворотний – 16. Таким чином, реактор при збереженні спрямованості руху суспензії поділяється на вхідну і вихідну частину, які приєднані до газомасообмінника на виході і вході, відповідно.

У трубчастому реакторі фірми BioFence, який може бути змонтований як у горизонтальній, так і у вертикальній площині, або під кутом на даху, використана система очищення внутрішньої поверхні трубок від обростання за рахунок постійної циркуляції запатентованих кульок разом із суспензією мікробіодоростей.

До числа переваг такої конфігурації трубчастих реакторів слід віднести відносну простоту конструкції. Проте швидкість руху рідини залежить від числа паралельних елементів, причому в різних трубках вона не обов'язково співпадає, що може призвести до інгібування (або лімітації) розвитку культур в окремих ділянках реактора. Крім того, при великій кількості паралельно включених трубок низхідна гілка реактора повинна мати надмірно великий діаметр для зниження опору потоку рідини, а газообмінник – підвищену ефективність.

Конструкція трубчастого реактора, яка дозволяє масштабувати процес культивування без втрати питомої продуктивності, була запропонована А.А. Циганковим (рис. 4.9). Усі елементи реактора сполучені послідовно, причому швидкість руху рідини не залежить від кількості елементарних комірок. У випадку, якщо світлоприймальні трубки різних елементарних комірок виконані з полімерних матеріалів (полівінілхлориду, фторопласту), вони можуть розташовуватися на одному каркасі, що спрощує монтаж реактора. До недоліків цієї конструкції слід віднести те, що кожна елементарна комірка вимагає свого газомасообмінника і має окремий вхід для газової суміші. Це ускладнює конструкцію і таким чином здорожує сам реактор і роботи по його складанню. У той же час таке масштабування дозволяє збільшувати об'єм реактора без втрати потенційного виходу біомаси.

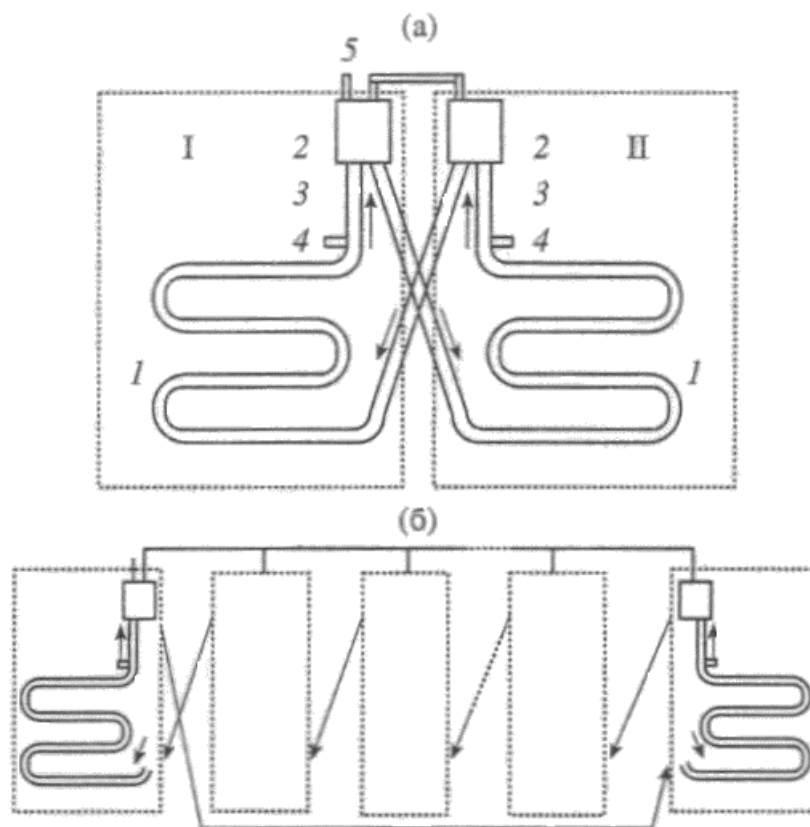


Рис. 4.9. Схема масштабування трубчастого реактора шляхом послідовного з'єднання елементарних комірок:

а – з'єднання двох елементів в один реактор. Газова суміш із комірки І входить у газомасообмінник комірки ІІ, і далі об'єднаний газовий потік виходить з комірки І;

б – з'єднання довільної кількості осередків в єдиний реактор

1 – освітлювана частина реактора; 2 – газомасообмінник; 3 – аерліфт; 4 – вхід газу; 5 – вихід газу.

Стрілками вказаний напрямок руху культури.

4.3.5. Реактори на основі коаксіальних циліндрів

У реакторах цього типу культура знаходиться в кільцевому проміжку між двома співвісними прозорими циліндрами. Освітлення може проводитися як зовнішнім джерелом світла, так і джерелом, розташованим на осі циліндрів усередині них. В останньому випадку реактор є більш компактним, а кількість світлової енергії, яка поглинається культурою мікрроводоростей, розраховується так само легко, як і в разі пласкопаралельної кювети. Цей тип реактора має практично ті ж самі переваги і недоліки, що і кювети, описані раніше. Проте організація простору для культури у вигляді кільцевого проміжку вже дозволяє ввести механічний пристрій для перемішування, що усуває значну частину недоліків

пласкопаралельної конструкції. Для цього в кільцевий проміжок вводять багатополісний магніт у вигляді кільця, який приводиться в обертання зовнішнім магнітним полем. В апараті такого типу при обертанні пристрою, який здійснює змішування в одному напрямку, може виникати ламінарний рух рідини з відносно слабким перемішуванням сусідніх шарів. Крім того, можливе виникнення “тіньових” зон, де швидкість руху рідини недостатня і внутрішня поверхня реактора легко обростає мікроводоростями. Для усунення цих явищ через певний проміжок часу (звичайно 2-5 хв) відбувається реверсування руху магнітного поля за допомогою зовнішнього електронного пристрою. Щоб уникнути зриву обертання перемішуючого пристрою при реверсуванні на високих швидкостях, за допомогою зовнішнього електронного пристрою необхідна частота обертання встановлюється не відразу, а плавно від нуля до заданого значення.

Масштабування описаної конструкції до об'єму більше 15-20 л проблематичне, тому реактори такого типу відносять до лабораторних. А.А. Циганков вважає, що такий тип конструкції можна віднести до апаратів повного змішування, оскільки час встановлення рівноваги середовища після зміни одного з чинників відбувається протягом 1,5-2 с при швидкості обертання перемішуючого пристрою 100 об/хв. Ця система найбільшою мірою відповідає вимогам, які пред'являються до лабораторних фотобіореакторів: легко стерилізується автоклавуванням або текучою парою; газомасообмін відбувається в тому ж об'ємі, що і процес фотосинтезу. Розрахунки енергії світла, яке поглинула культура, прості внаслідок точно вимірюваної світлоприймальної поверхні. Установка датчиків безпосередньо всередині реактора дозволяє проводити інструментальний контроль процесу культивування. Підтримка постійного об'єму, що необхідно для безперервного культивування, здійснюється приєднанням пристрою зливу по рівню, стандартному для ферментерів. Проте товщина освітлюваного шару культури не може бути менше ніж 8-13 мм унаслідок обмежень розміру перемішуючого пристрою. Це зменшує можливості використання реактора при вивченні потенційної продуктивності мікроводоростей.

Додаткове введення світла з метою інтенсифікації процесу крізь спеціальні вікна в днищі можливе не тільки від внутрішнього, але і від зовнішнього джерела світла. На перемішуючому пристрої встановлюють не лопаті, а прозорі стрижні. При обертанні прозорі стрижні перемішують культуральну суспензію і одночасно при проходженні стрижня над освітлюваним віконцем не перешкоджають надходженню світла всередину культуральної суспензії. Це дозволяє більш рівномірно розподіляти світло всередині реактора без інгібування культури. Недоліком реактора з перемішуючим пристроєм є практична неможливість обрахунку кількості світлової енергії, що поглинається суспензією мікроводоростей. Вимірювання цього параметра необхідне для обліку матеріально-

енергетичного балансу культур і можливе при такому типі конструкції тільки за допомогою актинометричних методів. Крім того, така конструкція складна в монтажі та експлуатації і потребує подальшої модифікації.

Ціла низка пропозицій по створенню реакторів на основі коаксіальних циліндрів була запропонована групою А.А. Штоля з Красноярську (Ковров, Штоль, 1972). Один з таких реакторів складається з горизонтальних концентрично встановлених циліндрів, у простір між якими введена спіральна перегородка таким чином, щоб культура рухалася по спіралі між циліндрами. Сам реактор включали в контур рециркуляції з насосом і газомасообмінником, отже, принцип культивування відповідав трубчастому реактору.

Ці ж автори запропонували культиватор, який також складався з горизонтально розташованих концентричних циліндрів. Фотобіореактор заповнювався культурою на 0,5-0,8 об'єму, а перемішування здійснювалося обертанням зовнішнього циліндра. Проте складність конструкції апарату обмежила його застосування.

Останнім часом для виробництва фотобіореакторів використовують прозорі пластикові плівки, які значно здешевлюють вартість і загальну масу обладнання. Восени 2007 року Vertigro Energy – сумісне підприємство компаній Valcent Products Inc. і Global Green Solutions провела комерційне тестування експериментальної установки VertiGro (м. Ель-Пасо, штат Техас, США) з культивування мікробіодоростей. Фотосинтетична частина реактора являє собою серію з декількох десятків вертикально розташованих прозорих пластикових мішків, які наповнюються суспензією водоростей. Мішки підвішують у теплиці на відстані 20-30 см один від одного і освітлюють сонячним світлом. Внутрішній об'єм мішків за рахунок з'єднання протилежних плівок у горизонтальному напрямі поділений на горизонтальні сегменти, з'єднані в єдину систему завдяки невеликим отворах, розмір яких дозволяє регулювати швидкість руху суспензії згори вниз. Товщина шару суспензії в мішку не перевищує 4 см, що є достатнім для ефективного освітлювання всього об'єму культури. Культуральна суміш із масообмінного резервуару надходить у верхню частину пластикового мішка і по внутрішніх сегментах, які замкнуті в єдину систему, стікає донизу, де потрапляє в магістральну трубу і далі в масоприймач. Схема такого реактора є комбінацією схем, наведених на рис. 4.7 і 4.9. У межах одного мішка культура переміщується по послідовно з'єднаних сегментах, а вся серія мішків з'єднана паралельно.

4.3.6. Критерії оцінки продуктивності фотобіореакторів

Пошук найбільш ефективної конструкції фотобіореактора, яка забезпечує високі швидкості росту мікробіодоростей на всіх етапах культивування, здійснюється згідно з

декількома критеріями. Більшість цих параметрів розроблена для оцінки якості ферментерів глибинного культивування мікроорганізмів і дозволяє кількісно оцінювати якість перемішування суспензії і швидкість розчинення газу в апараті. Найчастіше ріст культур фототрофних мікроорганізмів лімітує нестача світла, а не газового живлення. Це пов'язано з тим, що швидкість росту відомих фототрофних мікроорганізмів значно нижча за швидкість росту хемотрофів.

В основному підходи до аналізу кінетики мікробного росту були розроблені протягом 1940 – 1970 років і базуються на рівнянні Моно, згідно з яким швидкість росту культури лімітується концентрацією субстрату:

$$\mu = \mu_{\max} C_S / (K_S + C_S), \quad (4.4)$$

де μ і $\mu_{\max}$ – реальна і максимальна швидкості росту відповідно;

C_S – концентрація субстрату;

K_S – константа насичення.

Припускається, що швидкість росту культури описується кінетикою першого порядку

$$dX/dt = \mu X, \quad (4.5)$$

де X – концентрація культури.

У разі обмеження доступності субстрату ріст культури при недостатньому освітленні відбувається за формулою

$$C_S = \frac{I_0 S_f}{V \epsilon X} \quad (4.6)$$

де S_f – освітлювана поверхня реактора;

V – об'єм реактора;

I_0 – інтенсивність падаючого світла;

ϵ – коефіцієнт екстинкції культури.

З рівнянь (4.4), (4.5) і (4.6) отримуємо рівняння (4.7).

$$\frac{dX}{dt} = I_0 \frac{S_f}{V} \frac{\mu_M}{K_S + \frac{I_0 S_f}{V \epsilon X}} \quad (4.7)$$

де I_0 – інтенсивність світла;

S_f/V – описує конструктивні особливості фотобіореактора;

$\mu_{\max}$, K_s і ϵ – характерні параметри самої культури.

Рівняння (4.5) показує, що швидкість росту за інших однакових умов гіперболічно залежить від S_f/V , тобто від відношення поверхні реактора до його об'єму. Для реакторів простої форми, зокрема у вигляді паралелепіпеда, це відношення відповідає товщині шару, який освітлюється.

При $I_0 S_f / V \epsilon X \ll K_s$ культура знаходиться в лінійній фазі росту, і його швидкість не залежить від концентрації біомаси. Таким чином, з рівняння (4.7) виходить, що відношення площі поверхні до об'єму може служити простим параметром порівняння різних реакторів при оцінці забезпечення культур світлом. На прикладі мікроводорості *Porphyridium cruentum* було показано, що збільшення відношення поверхні до об'єму втричі призводило до триразового збільшення виходу біомаси при вирощуванні культури в трубчастому біореакторі при помірній інтенсивності падаючого світла. При цьому культура знаходилася в лінійній фазі росту, коли гіперболічну залежність можна апроксимувати лінійно.

На підставі емпіричного розгляду процесу росту культур фототрофних мікроорганізмів у лінійній фазі був запропонований ще один параметр для порівняння біореакторів – концентрація мікроорганізмів, при якій частка клітин, які освітлюються світлом з інтенсивністю більшою, ніж мінімально можлива для росту культур (I_c), складає 50 %. Слід зазначити, що цей параметр залежить не тільки від геометричних характеристик реактора, але і від властивостей культури (коефіцієнт екстинкції, I_c), які неоднакові для різних об'єктів, а також інтенсивності падаючого світла, яку можна змінювати довільно. Тому цей параметр не може служити критерієм порівняння біореакторів, оскільки залежить від невизначених чинників.

На практиці вирощування культур фототрофних організмів часто відбувається за високих інтенсивностей падаючого світла, коли швидкість росту інгібується високою I_0 . У цьому випадку, припускаючи неконкурентний характер інгібування росту культур залежно від інтенсивності падаючого світла I_0 , рівняння (4.7) перетвориться на

$$\frac{dX}{dt} = I_0 \frac{S_f}{V} \frac{\mu_M}{K_s + \frac{I_0 S_f}{V \epsilon X}} \frac{K_i}{K_i + I_0} \quad (4.8)$$

де K_i – константа фотоінгібування росту культур.

Рівняння (4.8) не може дати явної залежності швидкості росту культури від геометричних характеристик біореактора, оскільки константа K_i не є постійною по всій

освітлюваній поверхні даного реактора і може бути різною для однієї й тієї ж культури в різних реакторах.

У цілому, розрахунок газообмінних характеристик у трубчастих реакторах не відрізняється від розрахунків для аерліфтних ферментерів. Слід зазначити, що в реакторах із просторовим розділенням газомасообміну і фотосинтезу необхідна ще і характеристика гомогенності перемішування. Для цього використовують метод визначення динаміки зміни рН усередині реактора при імпульсному додаванні лугу або кислоти.

У випробовуваних біореакторах відношення поверхні до об'єму варіює в діапазоні 53-86 м⁻¹. Об'єм темної зони не перевищує 10 % від робочого об'єму. А.А. Циганковим показано, що відношення освітлюваної поверхні до об'єму, що ділиться на товщину шару суспензії, можна використовувати як просте і грубе наближення для порівняння різних фотобіореакторів із близьким газомасообміном і порівнюваною швидкістю та турбулентністю руху культуральної суспензії.

Промислове культивування фототрофних мікроорганізмів до останнього часу проводили головним чином у мілких ставках круглої або видовженої форми, часто без перемішування і аерації. Відкриті системи культивування являють собою класичний процес продукування біомаси водоростей. Усі вони вимагають великої поверхні і залежать від регіональних кліматичних і погодних умов. Для біореактора відкритого типу існують принципові труднощі в досягненні високої швидкості перемішування суспензії водоростей та зменшенні товщини освітлюваного водного шару, тому цей напрямок у біотехнології мікроводоростей вважають тупиковим.

Перспективним напрямком розвитку промислового культивування мікроводоростей є застосування закритих фотобіореакторів. Реактори закритого типу мають ряд переваг порівняно з відкритими:

- низькі втрати CO₂,
- менший ризик забруднення,
- регуляція температури,
- контрольована гідродинаміка,
- відтворюваність умов культивування,
- значно менша вимога до займаних площ.

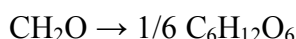
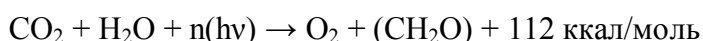
Однак забезпечення умов культивування, незалежних від умов оточення, вимагає значно більших капітальних вкладень і витрат на обслуговування порівняно з відкритими системами. На завершення необхідно відмітити, що до теперішнього часу проблеми, пов'язані зі створенням фотобіореактора, який би легко масштабувався, дозволяв вести процес культивування чистих культур при регулюванні необхідних параметрів, а також при

дії світлового поля з малим градієнтом і при цьому забезпечував високу інтенсивність ведення процесу, не вирішені.

5. ВИКОРИСТАННЯ МІКРОВОДОРОСТЕЙ В АЛЬТЕРНАТИВНІЙ ЕНЕРГЕТИЦІ

5.1. Ефективність фотосинтетичної трансформації енергії

Ріст і розвиток мікроводоростей забезпечується енергетично за рахунок фотосинтезу – процесу перетворення сонячної енергії на енергію хімічних зв'язків органічних сполук, головним чином вуглеводів. Загальне рівняння фотосинтезу можна навести в такому вигляді:



На поверхню Землі за рік надходить величезна кількість сонячної енергії – приблизно $5,7 \cdot 10^{24}$ Дж, однак ефективна концентрація цієї енергії в будь-якій точці Землі невелика навіть опівдні в безхмарний день – як максимум лише близько 1 кВт/м². Тому для накопичення і передачі сонячної енергії необхідні значні витрати, що обмежує її пряме використання в якості основного енергетичного джерела. У той же час фотосинтезуючі організми використовують цю енергію для фіксації великих кількостей CO₂ (близько $1,5 \cdot 10^{10}$ т, для чого споживається $3 \cdot 10^{21}$ Дж/год). Щорічно рослини і водорості накопичують до 10^{11} т целюлози і утворюють $2 \cdot 10^8$ т вільного кисню, єдиним джерелом якого на Землі є фотосинтез (Monteith, 1977). Завдяки фотосинтезу водорості Світового океану за рік утворюють близько $1,8 \cdot 10^{11}$ т сухої біомаси; приблизно таку ж кількість біомаси синтезують щороку рослини суходолу. Близько 7 % органічних продуктів фотосинтезу використовується для харчування людини і тварин, як паливо і будівельні матеріали.

Викопні палива теж є похідними продуктів фотосинтезу, які були утворені багато тисячоліть тому. Річне їх використання складає 86 % загального енергоспоживання – 500 ЕДж ($5 \cdot 10^{20}$ Дж) або 15 ТВт ($1,5 \cdot 10^{13}$ Вт) і приблизно досягло щорічного приросту біомаси, у той час як частка інших джерел енергії у світовому енергобалансі складає 6,5 % для гідроенергетики, 6 % для ядерної енергетики і лише декілька відсотків енергії видобувають при використанні геотермальної, вітрової та біоенергії (International Energy Annual, 2005). При спалюванні викопних палив утворюється щорічно $21,3 \cdot 10^9$ т вуглекислого газу, половина якого поглинається природними системами, а $10,65 \cdot 10^9$ т викидається в атмосферу, посилюючи парниковий ефект і негативно впливаючи на зміни клімату. Хоча фотосинтез – один із процесів, які споживають великі кількості CO₂, лише невелика частка енергії, запасеної кожен рік глобальним фотосинтезом, використовується для енергетичних потреб. Підвищення частки сонячної енергії в загальному балансі енергоспоживання розглядається зараз як найважливіше завдання. Хоча ефективність перетворення енергії світла на

електричну енергію в сучасних сонячних батареях досягає 12-15 % і значно перевищує навіть максимальну теоретичну ефективність фотосинтезу, розробка біоенергетики на основі таких фотосинтезуючих організмів, як мікрободорості, має багато суттєвих екологічних переваг, зокрема сприяє зменшенню викидів парникових газів.

Утилізація при фотосинтезі енергії сонячного випромінювання, яке досягає земної поверхні, становить не більш 0,1 %. Рослини поглинають світло з довжиною хвиль від 400 до 700 нм – т.зв. фотосинтетично активну радіацію (ФАР). Інфрачервоне випромінювання є непридатним для фотосинтезу оксигенних організмів (вищих рослин і водоростей), хоча використовується деякими фотосинтезуючими бактеріями, нездатними до утворення вільного кисню. ФАР складає близько 50 % сонячного світла; її інтенсивність на земній поверхні – 800-1000 Вт/м².

Найпродуктивніші рослини (напр., цукрова тростина) у середньому за рік засвоюють близько 2-4 % енергії падаючого випромінювання, а зернові культури – не більше 1 %. Звичайно, сумарна продуктивність фотосинтезу обмежена вмістом CO₂ в атмосфері (0,03-0,04 % за об'ємом), інтенсивністю світла і температурою. За сприятливих умов ефективність фотосинтетичного перетворення енергії світла мікрободоростями досягає 5-6 %. Переробка врожаю в 60 т/га на рік дозволяє отримати 75000 кВт-год електрики. Холл (Hall, 1976) повідомляв, що в Каліфорнії водорості дають врожаї в 100 кг/га на день у відкритих водоймищах. Краща середня біопродуктивність за рік складає ~ 1 г сухої маси м⁻² год⁻¹, а в закритих фотобіореакторах при інтенсивному культивуванні досягає ~ 2-3 г сухої маси м⁻² год⁻¹.

Мінімальна теоретична кількість світла, необхідна для фотосинтетичного виділення однієї молекули кисню, складає 8 квантів: чотири кванти потрібні для збудження фотосистеми II (ФСII) і чотири – для збудження фотосистеми I (ФСІ) (Chain, Arnon, 1977). У мікрободоростей за оптимальних умов одна молекула кисню утворюється при поглинанні 8-10 фотонів (Emerson, 1958). Квантовий вихід роботи реакційних центрів ФСII і ФСІ є близьким до 100 %. Виходячи з цього, можливо оцінити теоретичну ефективність конверсії світлової енергії при фотосинтезі, яка визначається як співвідношення вільної енергії, що збережена у формі молекули вуглеводу, до поглинутої світлової енергії. При поглинанні 8 квантів червоного світла, загальна енергія яких складає біля 1400 кДж, відбувається відновлення однієї молекули CO₂, для чого потрібно 480 кДж/моль. Таким чином, максимальна енергетична ефективність відновлення вуглекислоти при фотосинтезі складає 34 %. Але на практиці фотосинтезуючі організми перетворюють сонячну енергію з ефективністю 0,5-3 % (Monteith, 1977). Розуміння причин, які призводять до зниження

ефективності перетворення сонячної енергії, є необхідним для створення умов високопродуктивного фотосинтезу (Long et al., 2006; Zhu et al., 2008).

Втрати енергії за рахунок відбиття
і неспецифічного поглинання сонячної енергії

Завдяки слабкому оптичному поглинанню хлорофілу в зеленому діапазоні, рослинність не є досконалим адсорбентом ФАР. Саме тому більшість рослин мають зелений, а не чорний колір. Близько 10 % ФАР відбивається; через це відбиття рослина втрачає ~ 4,9 % від загальної кількості квантів сонячної радіації (табл. 5.1). Крім того, фотосинтезуючі організми містять різноманітні нефотосинтетичні пігменти, які поглинають світло. Оскільки енергія цих квантів не передається у фотосинтетичний апарат, загальна ефективність перетворення сонячної енергії знижується.

Таблиця 5.1. Втрати енергії при фотосинтетичній утилізації сонячного світла (за даними Hall, 1976; Zhu et al., 2008)

	Втрати енергії	Доступна світлова енергія		
На рівні моря		100 %		
Світлова фаза фотосинтезу				
Частка фотосинтетично активної радіації (ФАР)	51,3 %	48,7 %		
Відбиття, поглинання і перенос енергії	4,9 %	43,8 %		
Фотохімічно неефективна радіація	6,6 %	37,2 %		
Синтез вуглеводів (темнова фаза фотосинтезу)				
	C ₃ - фотосинтез	C ₄ - фотосинтез	C ₃ - фотосинтез	C ₄ - фотосинтез
Фіксація CO ₂	24,6 %	28,7 %	12,6 %	8,5 %
Фотодихання	6,1 %	0 %	6,5 %	8,5 %
Дихання	1,9 %	2,5 %	4,6 %	6,0 %
Максимальна теоретична ефективність перетворення сонячної енергії	C ₃ -фотосинтез – 4,6 % C ₄ -фотосинтез – 6,0 %			

Втрати енергії при швидкій релаксації
вищих збуджених станів хлорофілу

Енергія фотона визначається як hc/λ , унаслідок чого енергія блакитного фотона (400 нм) є на 75 % вищою за енергію червоного фотона (700 нм). Однак вищі збуджені стани хлорофілу дуже швидко дезактивуються, і фотохімічні реакції в реакційному центрі

збуджуються, врешті-решт, за рахунок поглинання червоного фотона незалежно від того, яка довжина хвилі була в первинно поглинутого кванта світла (Zhu et al., 2008).

Таким чином, у фотосинтезі не може бути використана додаткова енергія фотонів блакитної частини сонячного спектра. Середня енергія моля фотонів ФАР складає приблизно 205 Дж. Для запуску процесу розділення зарядів у ФСII необхідно приблизно 176 кДж/моль (що дорівнює енергії моля фотонів з $\lambda = 680$ нм), а для фотохімічного збудження ФСІ потрібно 171 кДж/моль ($\lambda = 700$ нм).

Таким чином, середня втрата енергії між поглинанням і розділенням зарядів у цих фотосистемах буде становити приблизно $(205 - (176 + 171)/2)$ кДж/моль; тобто, як мінімум 6,6 % від падаючої сонячної енергії безповоротно втрачається у вигляді тепла з-за релаксації вищих збуджених станів хлорофілу.

Втрати енергії в темновій фазі фотосинтезу

Величина втрат цього типу відрізняється між C_4 - і C_3 -рослинами з-за різної потреби в АТФ двох фотосинтетичних шляхів.

Для засвоєння однієї молекули CO_2 у циклі Кальвіна з утворенням молекули вуглеводу і регенерації рибулозо-1,5-бісфосфату (РБФ) необхідні три молекули АТФ і дві молекули НАДФН, для чого потрібна енергія, як мінімум, восьми червоних фотонів – 1388 кДж. Одна шоста моля глюкози – еквівалент одновуглецевого вуглеводу – містить 477 кДж енергії. Отже, втрата енергії на шляху від реакційного центра до синтезу вуглеводу становить $(1 - 477/1388)$; це рівнозначно втраті в цих реакціях 24,6 % енергії сонячного світла. Максимальна ефективність енергетичної трансформації в C_3 -фотосинтезі складає, таким чином, 12,6 % (без урахування втрат на дихання і фотодихання) (табл. 5.1)

C_4 -фотосинтез

Найбільш продуктивними наземними рослинами є рослини з C_4 -типом фотосинтезу (кукурудза, цукрова тростина, сорго). Для асиміляції однієї молекули CO_2 в C_4 -циклі використовується 5 молекул АТФ і 2 молекули НАДФН. Додаткові порівняно з циклом Кальвіна 2 молекули АТФ утворюються за рахунок циклічного електронного транспорту і необхідні для енергетичного забезпечення транспорту CO_2 з зовнішнього мезофілу і концентрування його поблизу Рубіско. Протікання C_4 -циклу потребує мінімум 12 фотонів. Підвищення концентрації CO_2 мінімізує фотодихання. Відповідний розрахунок $(1 - 477/2052)$ дозволяє оцінити, що втрати енергії при C_4 -фотосинтезі складають 28,7 % падаючої сонячної енергії (табл. 5.1), і, відповідно, максимальна ефективність енергетичної трансформації в C_4 -фотосинтезі складає 8,5 %.

Втрати енергії при фотодиханні

У всіх еукаріотичних клітинах асиміляція CO_2 відбувається за участю Рубіско – ферменту, який каталізує як карбоксилування, так і оксигенацію п'ятиуглецевого цукру – РБФ. У ході реакції оксигенації утворюється гліколат, який метаболізує з вивільненням молекул CO_2 і фосфогліцерату, що знову надходить у цикл Кальвіна. Цей процес, відомий як фотодихання, знижує ефективність фотосинтезу через вивільнення нещодавно асимільованого CO_2 і потреби в додаткових кількостях АТФ і НАДФН. CO_2 є конкурентним інгібітором оксигеназної активності Рубіско, тому в C_4 -рослинах, де концентрація CO_2 поблизу Рубіско в 10 разів вища за C_3 -рослини, фотодихання практично пригнічене.

При підвищенні температури розчинність CO_2 знижується, а розчинність O_2 підвищується, унаслідок чого втрати ефективності, викликані фотодиханням, зростають зі збільшенням температури. Виходячи з того, що сучасна атмосферна концентрація CO_2 складає 0,038 %, а концентрація $\text{O}_2 \sim 21$ %, втрати енергії в процесі фотодихання при 30 °C оцінюються в 6,1 % (табл. 5.1). У міру зростання вмісту CO_2 в атмосфері C_4 -рослини будуть втрачати переваги порівняно з C_3 -рослинами.

У мікроводоростях функціонує CO_2 -концентруючий механізм, пов'язаний з активністю ферменту карбоангідрази і взаємоперетворенням вуглекислого газу в бікарбонат-аніон. За рахунок цього в клітинах мікроводоростей підтримується високий вміст CO_2 , що сприяє усуненню фотодихання.

Втрати енергії через дихання

Дихання, яке відбувається в мітохондріях еукаріотичних водоростей або в тилакоїдах і плазматичних мембранах ціанобактерій, може бути виміряне лише емпірично. Хоча дихальна активність не пов'язана з фотосинтезом, вона є важливою характеристикою при визначенні загальної продуктивності культур. Втрати енергії при диханні оцінюються в 1,9 % у C_3 -рослин і в 2,5 % у C_4 -організмів. Таким чином, максимальна ефективність перетворення сонячного випромінювання в біомасу при 30 °C складає 4,6 % у C_3 -рослин і 6,0 % у C_4 -рослин (табл. 5.1).

Шляхи підвищення фотосинтетичної продуктивності

Очевидно, що фотосинтезуючі організми здатні перетворювати сонячну енергію з ефективностями, наближеними до максимальної, лише за оптимальних умов протягом коротких проміжків часу. Мікроводорості є вельми продуктивними культурами, які демонструють високу ефективність енергоперетворення (Melis et al., 1998; Gordon, Polle, 2007). Можна виокремити декілька причин високої, порівняно з рослинами, фотосинтетичної продуктивності мікроводоростей:

- 1) Простота організації. Фотосинтез у рослинах відбувається лише в листках, забезпечуючи ріст і розвиток усіх органів, причому маса рослини набагато перевищує масу листків. На відміну від цього, усі клітини мікроводоростей є фотосинтезуючими;
- 2) У силу невеликих лінійних розмірів мікроводорості мають розвинену поверхню, що сприяє ефективному поглинанню світла;
- 3) За умов штучного культивування мікроводорості зазвичай ростуть у присутності високих концентрацій CO_2 або бікарбонату, тобто при гальмуванні фотодихання.

Середня фотосинтетична ефективність за вегетаційний період є набагато меншою, ніж її теоретичні оцінки. При низькому освітленні швидкість фотосинтезу зростає лінійно зі зростанням інтенсивності світла. Якщо діюче світло за інтенсивністю перевищує чверть від повного сонячного потоку, фотосинтез уповільнюється і практично припиняється, коли інтенсивність досягає приблизно половини повного сонячного випромінення. За умов високого світла активуються фотопротекторні механізми, які цілеспрямовано функціонують у напрямку дисипації надлишку сонячної енергії і призводять до зниження ефективності. Головну роль у захисних реакціях фотосинтетичного апарату від пошкодження високим світлом відіграють світлозбиральні комплекси тилакоїдів – т.зв. антени. Розмір антени у фотосинтетичному апараті зелених одноклітинних водоростей зазвичай складає приблизно 470 молекул хлорофілу (100 %), з них 230 молекул входять до складу ФСII і 240 – до складу ФСI (Polle et al., 2002). Співробітники лабораторії Меліса показали, що ефективність фотосинтетичного перетворення енергії зростає при зменшенні розмірів антени (Melis et al., 1998; Gordon, Polle, 2007). Згідно з цими розрахунками, зменшення розміру антени до 195 молекул хлорофілу призведе до збільшення ефективності перетворення світлової енергії до 30 % і навіть до 60 %, якщо антену зменшити до 133 молекул. Автори вважають, що це буде відбуватися за рахунок редукції фотопротекторних механізмів, які призводять до дисипації поглинутої світлової енергії в тепло. Метою своєї роботи на майбутнє ця група вчених проголосила конструювання нових видів мікроводоростей зі зменшеною антеною. До цього можна додати, що оптична густина суспензій таких мікроводоростей буде значно нижчою за щільність звичайних культур, що сприятиме кращому світлопостачанню.

Увага до мікроводоростей як продуктивних організмів, здатних до запасання сонячної енергії, швидко зростає в зв'язку з перспективами створення альтернативних енерготехнологій. Розробляються технології застосування мікроводоростей для виробництва біодизелю, рідких вуглеводнів. Мікроводорості здатні до світлозалежного продукування водню – палива майбутнього. Конкретні перспективні напрямки використання мікроводоростей у біоенергетиці розглянуті нижче.

5.2. Молекулярний водень – екологічно безпечний для довкілля поновлюваний носій енергії

Сучасна енергетика, яка базується головним чином на спалюванні викопних вуглецевмісних палив, пов'язана з викидами в атмосферу величезної кількості парникових газів, кислотоутворюючих оксидів азоту і сірки, що завдають прямої шкоди навколишньому середовищу. Зі зростанням надходження до атмосфери вуглекислого та інших газів, що викликають парниковий ефект, пов'язують глобальні зміни клімату, які загрожують усьому живому на Землі. Крім того, згідно з оцінками експертів, запаси викопних палив будуть вичерпані вже через 50-100 років. Їх нестача, розвиток парникового ефекту і загроза незворотного забруднення навколишнього середовища спонукають до термінових пошуків альтернативних джерел енергії, заснованих на використанні поновлюваних ресурсів, зокрема, енергії Сонця. Таким екологічно безпечним для довкілля поновлюваним носієм енергії є молекулярний водень (Peschek, 1979a, 1979b; Lindblad, Sellstedt, 1990; Lindblad, 1999).

Водень – це екологічно чисте паливо. Він має високу енергоємність, яка в 3-5 разів перевищує аналогічний показник для бензину й нафти. В енергетичному плані йому притаманні універсальні властивості: він є відновником, енергоносієм і паливом. Потреба у високоенергетичному і екологічно чистому паливі призвела до виникнення водневої енергетики, швидкий розвиток якої дозволяє стверджувати, що водень є паливом майбутнього (Серебрякова и др., 2001a; 2001б).

Останнім часом значний інтерес викликають біологічні способи отримання водню. У цьому відношенні на особливу увагу заслуговують фотосинтезуючі організми, серед яких найперспективнішими є мікродорості, оскільки їх вивчення дозволяє виявити взаємозв'язок фотосинтезу з процесом утворення водню (Rao, Hall, 1996). Здатність мікродоростей продукувати молекулярний водень за рахунок фотосинтетичного перетворення енергії обумовлена наявністю нелімітованого джерела енергії – сонячного світла, надлишку субстрату фотолізу – води, високої теплотворної здатності водню (29 ккал/г порівняно з 3,5 ккал/г для вуглеводнів), можливістю відновлювання процесу, і, нарешті, тим, що фотохімічне перетворення води до водню відбувається за нормальної температури без утворення токсичних проміжних сполук. Тому одним з найперспективніших напрямків вирішення ряду глобальних проблем, у тому числі енергетичної, є біотехнологія мікродоростей.

Мікродорості за сприятливих умов швидко ростуть, використовуючи енергію сонячної радіації. В умовах штучного вирощування обсяг урожаю може становити від 70 до

120 кг/м² сирової маси водоростей на рік залежно від вмісту поживних речовин у воді та інших умов. Рациональність їх вирощування ґрунтується на тому, що продуктивність водоростей на одиницю площі в 2-5 разів вища за традиційні агрокультури і види, які швидко ростуть (*Salix* або *Miscanthus* – витривалий багаторічний тропічний злак). Для свого росту й розвитку водорості використовують CO₂, який акумулюється і фіксується у формі біомаси та похідних продуктів. Вони здатні також поглинати CO₂ та NO₂ з промислових газів, більше того, ці газові відходи можна використовувати для вирощування водоростей. Тому культивування мікрowodоростей пропонується як спосіб біосорбції промислових викидів з високим вмістом CO₂. Одночасно досягається ефект зниження рівня CO₂ в атмосфері. Для їх вирощування придатна вода низької якості, з якої вони активно поглинають розчинні сполуки азоту та фосфат, що скорочує витрати на регенерацію води. Після сепарації водоростей та кінцевого доочищення воду знову можна використовувати для промислових цілей.

Культивування водоростей має великі перспективи у створенні відновлюваних джерел енергії. Виходячи з того, що мікрowodорості в наш час вважають “зеленим джерелом відновлюваного водню” (Ghirardi et al., 2000), одним з актуальних завдань сучасної альгобіотехнології є вивчення генетичного потенціалу мікрowodоростей як можливих продуцентів водню і пошук технологічних умов підвищення його виходу.

5.2.1. Синьозелені і зелені мікрowodорості – об’єкти біологічного способу отримання молекулярного водню

Утворення молекулярного водню є одним з факторів регуляції анаеробного метаболізму клітин, воно широко розповсюджене в природі. Продукування H₂ на світлі констатоване в низки бактерій, деяких мікроскопічних фотосинтезуючих зелених і синьозелених водоростей (ціанобактерій) (Бородин и др., 2000; Stencel, 2000; Masukawa, Sakurai, 2003).

Уперше здатність деяких одноклітинних зелених водоростей продукувати вільний водень продемонстрували 70 років тому Г. Гаффрон і Дж. Рубін (Gaffron, 1939, 1944; Gaffron, Rubin, 1942). У наступний період було показано, що ряд аеробних фотоавтотрофних прокаріотів, зокрема синьозелених водоростей, також потенційно здатні продукувати водень. Процеси виділення водню досліджувалися в цілому ряду видів та їх штамів. Перелік організмів, які здатні виділяти водень, поступово оновлюється. На сьогоднішній день накопичена певна інформація стосовно умов, сприятливих для фотовиділення водню, подекуди зі спробами проаналізувати механізм цього процесу в окремих представників.

З'ясовано, що фотовиділення молекулярного водню каталізують три типи ферментів: нітрогеназа і дві гідрогенази, відмінні за механізмом дії – поглинальна і оборотна, або двоспрямована гідрогеназа.

Нітрогеназа є ключовим ферментом системи азотфіксації. Це двокомпонентна ферментна система, яка каталізує нуклеотидзалежне відновлення N_2 з утворенням NH_3 . Поряд з відновленням N_2 нітрогеназа здатна утворювати молекулярний H_2 (Lindblad, 1999). Реакція його фотопродукування вимагає значних витрат енергії, крім того, цей процес дуже чутливий до впливу молекулярного кисню, тому утворений нітрогеназами водень здатен може цілком споживатися.

Окрім нітрогенази, в ціанобактерій функціонує гідрогеназна система, здатна уловлювати водень, який у них утворюється (Kerfin et al., 1978). Гідрогенази – це одна з груп Fe-S-вмісних ферментів, які каталізують реакції поглинання і виділення молекулярного водню.

Основна частина досліджень із продукування водню синьозеленими водоростями була проведена на азотфіксуючих штаммах. У цих організмів сумарне утворення водню є результатом виділення водню, каталізованого нітрогеназою, і його споживання, каталізованого, головним чином, поглинальною гідрогеназою. У досліджених ціанобактерій виявлено два типи гідрогеназ: поглинальний (генний кластер *hup*) і двоспрямований (генний кластер *hox*). Вивчення розподілу генів гідрогеназ та їх активності в 15 азотфіксуючих ціанобактерій показало, що всі вони містять кластер *hup*, а в 12 з них – також і *hox*. Хоча *Nostoc* PCC7422 має кластер *hox*, його активність у клітинних екстрактах дуже низька. У гетероцистної водорості *Anabaena variabilis* IAM M58 гідрогеназа кодується геном *hupSL* (Kerfin, Böger, 1982).

Поглиноальна гідрогеназа, яка кодується генами *hupS* і *hupL*, здатна окиснювати водень, щойно продукований за участю нітрогеназ. Ця гідрогеназа знайдена в усіх азотфіксуючих і в деяких неазотфіксуючих синьозелених водоростей, наприклад *Synechococcus* штам 6301 (Tamagnini et al., 2002; Lindberg et al., 2004).

Ціанобактерії, які містять так звану оборотну гідрогеназу, що каталізує як утворення, так і поглинання водню, за оптимальних умов виділяють до 4 мкмоль водню на 1 мг хлорофілу за годину. Гідрогенази досить чутливі до кисню, тому їх активність можна виявити лише в анаеробних умовах. Вони здатні продукувати водень у ході метаболічних реакцій не тільки в синьозелених водоростей, але й еукаріотичних організмів, зокрема зелених водоростей. Захоплені молекули водню зв'язуються в ході редокс-реакції, у результаті чого в присутності O_2 виділення водоростями водню знижується або припиняється зовсім (Tsygankov et al., 1998).

В еукаріотичних мікроводоростей, зокрема зелених, відмічається лише періодичне виділення водню, після темного періоду та анаеробної інкубації культури, які індукують здатність клітин до фотовиділення водню. Електронний транспорт крізь гідрогеназу спряжений з фотосинтетичним фосфорилуванням у тилакоїдних мембранах. Мономерна форма гідрогенази належить до класу Fe-гідрогеназ і кодується в ядрі одноклітинних зелених водоростей (Бородин и др., 2000).

Поглинання світла є необхідним етапом процесу виділення водню клітинами мікроводоростей, оскільки енергія світла забезпечує розкладання молекул води, вивільнення електронів і протонів, а також ендергонічний транспорт цих електронів до ферредоксину – переносника фотосинтетичного електронтранспортного ланцюга. Він є фізіологічним донором електронів для Fe-гідрогенази і таким чином зв'язує гідрогеназну реакцію з фотосинтетичним транспортом електронів у хлоропластах зелених водоростей (Florin et al., 2001).

Обов'язковою фізіологічною умовою активації гідрогенази в більшості організмів, які містять цей фермент, є різнотривала інкубація в безкисневому середовищі. Це пов'язано з тим, що виділення водню індукується в умовах анаеробного існування клітин у темряві, оскільки активність гідрогенази ефективно пригнічується в разі активації фотосинтетичного утворення кисню внаслідок конкурентних взаємовідношень процесів виділення кисню і водню. Отже, за умов аноксії розпочинається експресія гідрогенази – ферменту, який з високою питомою активністю каталізує утворення H_2 при освітленні (Ефимцев и др., 1975, Гоготов и др., 1976).

Кінетика інгібування виділення кисню після створення в середовищі умов аноксії здебільшого немонотонна. У *Chlorella vulgaris*, наприклад, протягом перших 3-7 хв. різко зменшується квантовий вихід виділення кисню до рівня, який у подальшому якщо і змінюється, то більш повільно. Ці повільні зміни можуть включати стадії як підвищення, так і зменшення виділення кисню, співвідношення яких залежить від інтенсивності світла та гідрогеназної активності. Вважається, що дія аноксії на фотосинтетичний апарат – це комплексний процес, який включає зміни не тільки аеробного стану системи, але й перехід на якісно новий режим функціонування. Припускається, що адаптивна роль гідрогенази у водоростей полягає в тому, що вона дозволяє їм більш гнучко реагувати на зміни локальної концентрації кисню в природних водно-грунтових екосистемах (Бойченко, 1980).

Грунтуючись на кінетиці змін швидкості виділення кисню і водню в умовах аноксії, висловлюється думка, згідно з якою відновлення пулів переносників електронів між фотосистемами і фотоутворення водню – відносно незалежні функції гідрогеназної системи. Перша функція проявляється одразу після переходу до умов аноксії. Можливо, вона частково

зберігається в аеробних умовах і спричинює швидку інактивацію центрів ФС II. Функція фотоутворення водню гідрогеназою розвивається відносно повільно і, напевно, відображає кінетику змін одного з факторів, які регулюють активність гідрогенази, наприклад, концентрації субстратів або інших факторів метаболічного контролю ферментативної активності (Бойченко, 1980).

У Каліфорнійському університеті вдалося одержати водень за допомогою прісноводної зеленої водорості *Chlamydomonas reinhardtii* (Stencel, 2000). Вважається, що з біомаси цієї водорості можна стабільно отримувати водень, інкубуючи її за умов відсутності сірки. Максимальний вихід водню при голодуванні за сіркою можна отримати за рН 7,7 з наступним його підвищенням до 8,2 або зниженням до 6,5. Профілі рН фотопродукції водню корелюють із залишковою активністю ФС II (оптимум – рН 7,3-7,9), з рН-профілями фотосинтетичного транспорту електронів у ФС I або гідролізу крохмалю і білка (Kosourov et al., 2003).

Нитчасті гетероцистні ціанобактерії мають унікальну здатність здійснювати основні процеси біосфери: окиснений фотосинтез і фіксацію молекулярного азоту. При цьому вони можуть утворювати молекулярний водень за участю гідрогенази і/або нітрогенази (Kerfin et al., 1978; Kerfin, Böger, 1982; Полесская, Красновский, 1990). Генеруючи водень, плівки фотосинтезуючих ціанобактерій суттєво впливають на еволюцію земної атмосфери. Протягом доби інтенсивне продукування кисню одноміліметровим шаром призводить до перенасичення киснем і утворення газових пухирців. Аналіз складу газів у пухирцях, проведений удень і вночі, показав, що в плівках, утворених *Lyngbya*, концентрація H_2 була в 10 тис разів вищою пізно вночі порівняно з днем. У плівках *Microcoleus* рівень H_2 також був найвищим вночі, проте варіювання “день-ніч” було значно меншим, можливо, тому, що *Microcoleus*, на відміну від *Lyngbya*, не утворює газових пухирців. Продукування H_2 автори пов’язують з активністю нітрогенази, яка спрямовує потік електронів до протонів з утворенням H_2 . Цей процес відомий у планктонних ціанобактерій морів і озер. Вважається, що в атмосфері Землі в минулому майже повністю був відсутній O_2 і продукований H_2 потрапляв у космос, тим самим суттєво збіднюючи відновний потенціал Землі (Jorgensen, 2001). Фотовиділення H_2 констатовано також у водоростей *Anabaena*, *Calothrix*, *Mastigocladus* (Kerfin, Böger, 1982).

Завдяки посиленій увазі до процесу фотовиділення молекулярного водню нагромаджено значний масив даних, які визначають умови, сприятливі для його інтенсифікації в різних мікрowodоростей. Здійснені окремі спроби аналізу механізмів цього процесу в деяких таксонів.

Синтез нітрогенази у фототрофних культур *Anabaena variabilis* визначається внутрішньоклітинним відношенням C/N. Іони амонію пригнічують не тільки синтез нітрогенази в ціанобактерій, але й інгібують активність ферменту при фізіологічних значеннях рН на світлі і в темряві. Синтез нітрогенази і гідрогенази, яка поглинає водень в *Anabaena variabilis*, наявність оборотної гідрогенази не є обов'язковими для гетероцистних ціанобактерій (Трошина, 2000).

Виявлено фізіологічні фактори, які впливають на гідрогеназну активність клітин ціанобактерій *Gloeocapsa alpicola* і *Chroococcidiopsis thermalis*. Л.Т. Серебрякова зі співавторами характеризують умови продукування водню на прикладі одноклітинної синьозеленої водорості *Gloeocapsa alpicola*. При автотрофному рості в її біомасі накопичується ендогенний полісахарид глікоген, у результаті бродіння якого за гомоацетатним циклом поряд з ацетатом і вуглекислим газом головним продуктом є водень. При цьому з одного глюкозного залишку утворюються 2 молі ацетату, 2 молі CO₂ і 4 молі H₂. Найактивнішими продуцентами H₂ були клітини *G. alpicola*, які вирощувались за дефіциту нітрату. За цих умов запаси глікогену в клітинах досягали 50 % сухої маси й активувалася гідрогеназа. Оптимізація виходу водню значною мірою визначалася співвідношенням тривалості світлового (фотогетеротрофний ріст – синтез глікогену) й темнового (бродіння глікогену) періодів (Трошина, 2000; Серебрякова и др., 2001a; 2001б). Ідентифіковані та охарактеризовані гени, які кодують гідрогенази цих водоростей, вивчена регуляція синтезу гідрогенази *G. alpicola* на рівні транскрипції в умовах, сприятливих для розвитку гідрогеназної активності, а також вивчені каталітичні властивості очищеної гідрогенази *G. alpicola* (Шереметьєва, Серебрякова, 2000; Шереметьєва, 2003).

Ряд ціанобактерій продукують водень як побічний продукт фіксації азоту. Одержано три гідрогеназні мутанти *Anabaena* sp. PCC 7120, один з яких, мутант *hupL*, продукував водень зі швидкістю в 4-7 разів більшою за дикий штам. Ефективність перетворення світлової енергії в H₂ становила 1,0-1,6 %, проте період найбільшої активності тривав лише 10 год. Акумуляція загального азоту в клітинах знижувала активність нітрогенази і продукцію водню. Активний сайт нітрогенази містив MoFe₇S₉ з координацією на гомоцитрат, що синтезується *Nifv* (Masukawa, Sakurai, 2003).

Заслужують на увагу дослідження, присвячені з'ясуванню особливостей метаболізму гетероцист ціанобактерій порядку Nostocales, які обумовлюють здатність цих водоростей виділяти газоподібний H₂ за умов освітлення. Молекулярний водень є побічним продуктом ферментативного відновлення N₂ до NH₃, яке здійснюється нітрогеназою в присутності АТФ – донора електронів і протонів. Молекулярний водень частково утилізується в гетероцистах гідрогеназою, яка відіграє роль донора електронів для нітрогенази і дихального ланцюга.

Останній забезпечує синтез АТФ і відновлення O_2 до води, тим самим попереджуючи O_2 -залежну інактивацію нітрогенази. Залежність виділення H_2 від дії світла визначається тим, що на світлі збільшується рівень відновлених продуктів, вміст АТФ або інших високоенергетичних інтермедіатів. На думку авторів, для підвищення фотопродукування водню можна застосовувати обробку клітин діуроном, аноксією, а також додавання в середовище ацетилену і сульфідів (Kerfin, Böger, 1982). Активність нітрогенази зростає в гетероцистах синьозелених водоростей за умов недостатньої кількості азоту.

Для виділення молекулярного водню використано різні азотфіксуючі ціанобактерії (*Anabaena*, *Calothrix*, *Nostoc*, *Scytonema* і *Synechococcus*). Морфологічно вони поділені на три основні групи: гетероцистні нитчасті, негетероцистні нитчасті й одноклітинні. Встановлено, що механізм продукування водню в кожній групі дещо відмінний.

Досліджуючи водночас молекулярну філогенію морських ціанобактерій, фіксуючих N_2 , та продуктивність H_2 кожного штаму, було показано, що продукування H_2 водоростями може визначатися генетично (Miyashita et al., 2004).

Синьозелена водорість *Gloeocapsa alpicola*, яка не фіксує молекулярний азот, здатна збільшувати вихід водню в разі дефіциту сірки (Antal, Lindblad, 2005). Аналогічно нестача азоту в середовищі стимулює виділення водню азотфіксуючою синьозеленою водорістю *Anabaena cylindrica*. Швидкість виділення водню водню суттєво гальмують сполуки сірки, піруват. Припускається, що дія пірувату пов'язана з його донуванням електронів у фотосинтетичний електронтранспортний ланцюг на рівні між першою і другою фотосистемами (Гоготов и др., 1976). Зростання продукування водню відзначено в дефіцитного на гідрогеназу мутанту гормогонієвої синьозеленої водорості *Nostoc punctiforme* штам NHM5 (Lindberg et al., 2004).

Для того, щоб на світлі виділявся водень, створювали умови для видалення з середовища атмосферного O_2 та запобігання появі в ньому O_2 фотосинтетичного походження. З цією метою на кафедрі генетики Московського державного університету з нитчастої гетероцистної ціанобактерії *Anabaena variabilis* ATCC29413 отримано мутант *Anabaena variabilis* PK84, якому властива надзвичайно низька здатність до поглинання водню. Завдяки цьому водень, який виробляє цей мутант у процесі азотфіксації, надходить у навколишнє середовище навіть у присутності атмосферного повітря (Mikheeva et al., 1995; Markov et al., 1997).

В.Б. Бородін зі співавторами (2000) досліджували фотоутворення молекулярного водню мутантною ціанобактерією *Anabaena variabilis* PK84, у якої була зруйнована система поглинання H_2 . Мутант вирощували на живильному середовищі, яке включало ванадій, в умовах, що забезпечували автотрофний ріст і азотфіксацію. Показано, що, на відміну від

дикого штаму *A. variabilis* ATCC 29413, виділення H_2 клітинами мутанту *A. variabilis* PK84 мало залежало від вмісту в середовищі O_2 і відбувалось навіть в атмосфері аргону зі швидкістю, яка перевищувала темпи продукування H_2 диким штамом. Автори вважають, що порівняно невисока швидкість продукування H_2 диким штамом в умовах чистого аргону є наслідком активної діяльності гідрогенази, яка “перехоплювала” і “спалювала” водень киснем фотосинтетичного походження. За періодичних умов вирощування мутанту в атмосфері аргону швидкість продукування H_2 молодого культурою досягала 90-100 мкмоль / (мг хлорофілу α -год), що відповідає 5,4-6,0 мкмоль / (мг сухої маси-год). Крім того, мутант був здатний безперервно утворювати H_2 в разі періодичного росту у фотобіореакторі спіраль-трубчастого типу (4,5 л). Найбільша швидкість утворення H_2 культурою *A. variabilis* PK84 у фотобіореакторі при продуванні аргонем становила 130-140 мл/год або 0,03 мл / (мл суспензії-год). На думку авторів, найпривабливішим є те, що *A. variabilis* PK84 здатна безперервно продукувати H_2 при продуванні повітрям, яке містить 2 % CO_2 , температурі 36 °C і світловому потоці 332 мкЕ/м²·с. Найбільша швидкість утворення H_2 за таких умов становила 43 мл/год на фотобіореактор, або 0,01 мл/(мг суспензії-год). Автори стверджують, що на період виконання даної роботи мутант *A. variabilis* PK84 мав найкращі показники серед відомих представників ціанобактерій для використання в системах з перетворення сонячної енергії на енергію H_2 . Крім того, для отримання водневого палива за допомогою ціанобактерій з'явилася можливість використання не інертних газів, що мають високу вартість, а значно доступніших – атмосферного повітря і двоокису вуглецю.

Для з'ясування можливих розбіжностей у гідрогеназній активності мікро- і макроскопічних водоростей проведено порівняльне дослідження одночасного виділення водню й кисню десятима видами морських водоростей. Для індукції гідрогеназної активності водорості протягом різних проміжків часу зберігали в умовах анаеробіозу в морській воді, яка не містила CO_2 . У той час як кожна з досліджених водоростей мала здатність виділяти кисень, продукування водню при цьому не спостерігалось. Один з висновків цієї роботи полягає в тому, що на відміну від мікроскопічних водоростей не виявлено жодного макрофіта, який би продукував водень на світлі. Це не суперечить відомому факту, згідно з яким щонайменше дев'ять макроскопічних водоростей відзначаються гідрогеназною активністю. Остання проявляється в їхній здатності виділяти водень у темряві й поглинати його на світлі. Проте, отримані дані не узгоджуються з традиційною точкою зору, що гідрогеназа водоростей може каталізувати цілий ряд реакцій, одна з яких супроводжується утворенням молекулярного водню. Автори наводять два можливі пояснення вказаних спостережень. Одне з них постулює, що крім CO_2 існують інші акцептори електронів, здатні

приймати відновлювальні еквіваленти від ФС I і тим самим блокувати реакції, які призводять до утворення водню на світлі. Але можливо, що гідрогеназна активність морських макроскопічних водоростей пов'язана тільки з системою поглинання водню. Проте перше пояснення має рацію лише в тому разі, якщо дію можливих електронних акцепторів за кінетикою можна порівняти з такою CO_2 . На думку авторів, цей простий кінетичний аргумент свідчить на користь другої можливості.

Оскільки коло організмів, здатних продукувати водень, точно не визначено, а умови інтенсифікації цього процесу потребують детальних з'ясування і уточнень, з метою пошуків нових нетрадиційних відновлюваних джерел водню співробітники відділу мембранології і фітохімії Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України провели дослідження можливості продукування молекулярного водню за рахунок фотосинтетичного перетворення енергії культурами гормогонієвих і хроококових синьозелених (Cyanophyta) і зелених (Chlorophyta) водоростей з колекції мікроводоростей IBASU-B. Основна увага була зосереджена на виявленні факторів, які впливають на перебіг фотосинтетичного процесу в клітинах мікроводоростей у напрямку, сприятливому для виділення водню.

Фотовихід водню дослідженими штамами стимулювався такими стресовими умовами, як темнова інкубація культур, аноксія шляхом витримування водоростей у потоці інертного газу. Цей процес стимулювали комплексним використанням екзогенних органічних субстратів, зокрема глюкози, інгібітора електронного транспорту діурону, субстрату з високим окисно-відновним потенціалом – метилвіологену, освітлення високої інтенсивності – щільність потоку фотонів $400\text{--}800 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. У результаті встановлено, що 19 досліджених штамів 16-ти видів гормогонієвих і хроококових синьозелених, а також зелених мікроводоростей різною мірою виявили здатність до фотовиділення молекулярного водню за умов стимулювання цього процесу.

Найактивнішими продуцентами водню серед досліджених штамів виявилися представник гормогонієвих гетероцистних синьозелених водоростей *Nostoc linckia*, 86, продукційна здатність якого досягала $10,69 \text{ нмоль водню на } 1 \text{ мг сухої маси за } 1 \text{ год}$, безгетероцистна гормогонієва синьозелена *Spirulina platensis* з виходом $9,46 \text{ нмоль водню}$ і зелена мікроводорість *Chlamydomonas reinhardtii*, яка виділяла $9,81 \text{ нмоль водню на } 1 \text{ мг сухої біомаси за } 1 \text{ год}$. Можна вважати, що ці об'єкти за здатністю продукувати водень в умовах пригнічення активності фотосистеми II є пріоритетними серед вивчених штамів. Можна сподіватися на їх використання в системах перетворення енергії сонячного світла на енергію водневого палива.

Два з чотирьох досліджених видів *Anabaena* – *A. cylindrica* і *A. sp.* характеризувалися меншою воденьутворюючою спроможністю – 6,46 і 6,16 нмоль на 1 мг сухої біомаси за 1 год відповідно.

Наведена інформація стосовно нових нетрадиційних шляхів отримання молекулярного водню шляхом трансформації сонячної енергії фототрофними мікроскопічними синьозеленими та зеленими водоростями свідчить про перспективність розвитку цього напрямку біотехнологічних досліджень. Екологічно чистий вид палива, одержаний з водоростей, без сумніву, є паливом майбутнього. Адже при згоранні водню не відбувається утворення вуглекислого газу і виділяється набагато більше енергії, ніж при згоранні бензину чи будь-якого іншого палива. Його можна використовувати для різних потреб господарської діяльності. Виходячи з того, що вихід водню з культур мікроводоростей ще досить малий по відношенню до потенційно можливого, розвиток біотехнологічних досліджень у цьому напрямку повинен бути спрямований на вдосконалення умов інтенсифікації процесу продукування молекулярного водню і на подальший відбір найбільш перспективних його продуцентів серед колекційних штамів мікроводоростей.

5.3. Ліпіди мікроводоростей та їх комерційне застосування

Високий біотехнологічний потенціал мікроводоростей далеко не в останню чергу визначається невід’ємною складовою частиною їх біомаси – ліпідами. За класичним визначенням, ліпіди – це речовини, які: а) нерозчинні у воді; б) розчинні в органічних розчинниках, таких як хлороформ, ефір чи бензол; в) мають у складі молекул вищі алкільні радикали і г) містяться в живих організмах (Кейтс, 1975). Середній вміст ліпідів у клітинах водоростей варіює від 1 до 70 %, а за певних умов може досягати навіть до 90 % маси сухої речовини (Metting, 1996). Вже зараз ліпіди мікроводоростей застосовуються в харчовій і фармацевтичній промисловості. Крім того, ліпіди є високоенергетичними сполуками – при їх спалюванні виділяється приблизно вдвічі більша кількість енергії, ніж при спалюванні вуглеводів чи білків (Ленинджер, 1985). З цього витікає, що багату на ліпіди біомасу мікроводоростей можна з успіхом використовувати в якості сировини при виробництві палива (детальніше про це див. у розділах 5.4 і 5.5).

Надзвичайне різноманіття організмів, об’єднаних узагальнюючим поняттям “мікроводорості”, обумовлює існування широкого спектра речовин ліпідної природи, продукованих цими організмами. Водорості містять багато типів ліпідів, притаманних вищим рослинам, таких як неполярні тригліцериди (рис. 5.1) та полярні глікозилгліцериди (рис. 5.2) і фосфогліцериди (рис. 5.3).

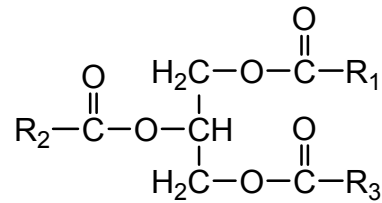


Рис. 5.1. Структура молекули тригліцериду (триацилгліцеролу):

R_1 , R_2 і R_3 – залишки жирних кислот відповідно в *sn*-1, *sn*-2 і *sn*-3 положенні молекули гліцеролу.

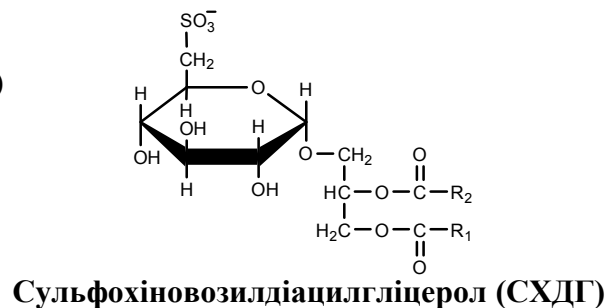
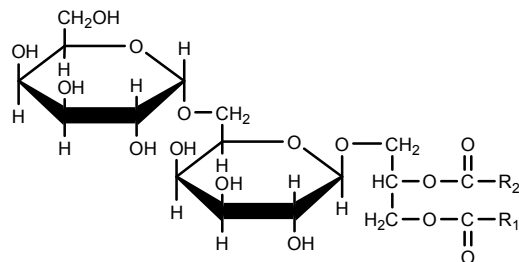
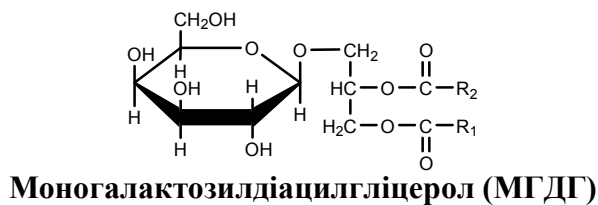


Рис. 5.2. Основні гліколіпіди (глікозилгліцериди) фотосинтетичних мембран:

R_1 і R_2 – залишки жирних кислот.

Велика кількість ліпідів живих організмів входить до складу клітинних мембран. Як і в усіх живих істот, мембранними ліпідами більшості органел водоростей є переважно фосфоліпіди (фосфогліцериди). Однак ліпідна складова мембран хлоропластів здатних до фотосинтезу еукаріот, а також синьозелених водоростей (ціанобактерій), представлена чотирма класами полярних гліцероліпідів, з яких фосфоліпідом є лише один – фосфатидилгліцерол (ФГ) (Harwood, 1998; Wada, Murata, 1998). Основну ж частку складають гліколіпіди (глікозилгліцериди) – 2 нейтральні галактоліпіди моногалактозилдіацілгліцерол (МГДГ) і дигалактозилдіацілгліцерол (ДГДГ), а також аніонний сульфоногліколіпід сульфохіновозилдіацілгліцерол (СХДГ).

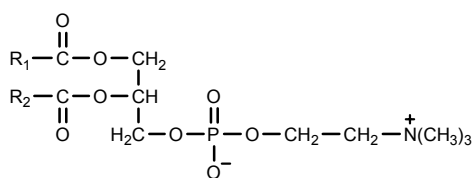
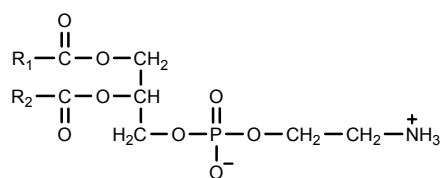
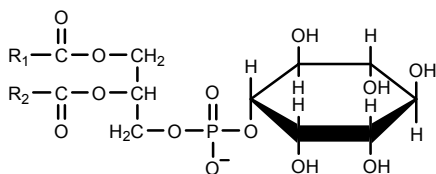
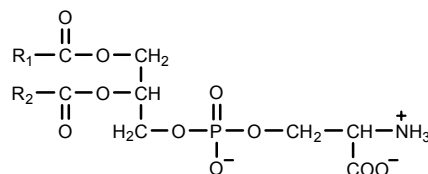
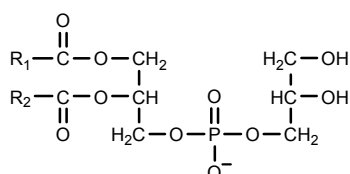
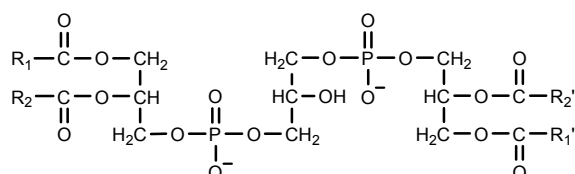
**Фосфатидилхолін****Фосфатидилетаноламін****Фосфатидилінозитол****Фосфатидилсерин****Фосфатидилгліцерол (ФГ)****Дифосфатидилгліцерол (кардіоліпін)**

Рис. 5.3. Основні фосфоліпіди (фосфогліцери) мембран:

R_1 і R_2 – залишки жирних кислот.

Оскільки основна частина внутрішньоклітинних мембран водоростей припадає на тилакоїди хлоропластів, то властиві для них ліпіди переважають в екстракті з цілих клітин (Harwood, 1998). У більшості випадків 4 гліцероліпіди – МГДГ, ДГДГ, СХДГ і ФГ – присутні в значній кількості, також істотні частки належать фосфатидилхоліну і фосфатидилетаноламіну.

Деякі водорості здатні запасати досить велику кількість ліпідів у формі триацилгліцеролів (до 57 % сумарних ліпідів), які відкладаються в цитоплазмі у вигляді великих крапель (Behrens, Kyle, 1996). У здорових клітинах, що активно діляться, частка тригліцеридів у загальній кількості ліпідів зазвичай є низькою. Однак перехід водоростей у стаціонарну фазу росту чи вплив деяких стресових чинників може стимулювати нагромадження тригліцеридів (Басова, 2005). Посилений синтез триацилгліцеролів та відкладання їх у запас вважається одним з елементів ранньої відповіді на ріст в умовах, коли кількість енергії, що надходить ззовні, перевищує можливості клітини утилізувати цю енергію шляхом росту й поділу клітин (Roessler, 1990). Для прокаріотичних синьозелених водоростей не властиве запасання ліпідів у формі триацилгліцеролів (Басова, 2005); практично всі їх жирні кислоти входять до складу полярних ліпідів, які утворюють велику систему фотосинтетичних мембран (Behrens, Kyle, 1996).

Окремі види чи порядки мікроводоростей нагромаджують такі незвичайні сполуки, як бетаїнові ліпіди, хлоросульфоліпіди чи деякі інші сульфоліпіди, вуглеводні, частково деацильовані або, навпаки, додатково ацильовані похідні гліко- і фосфоліпідів. Певні мікроводорості можуть містити глікозильовані похідні вищих полігідроксиспиртів чи полігідроксикарбонових кислот, вільні (неестерифіковані) жирні кислоти, вищі спирти, діацилгліцероли, сфінголіпіди, стероли й естери стеролів, естери воску, арсен-вмісні ліпіди, тригалактозилдіацилгліцерол (Harwood, 1998). Під визначення ліпідів підпадають також хінони, токофероли та зелені пігменти водоростей – хлорофіли.

Основні функції ліпідів у живих організмах узагалі і водоростях зокрема є дуже різноманітними:

- структурна функція – амфіфільні полярні ліпіди є одним з головних компонентів клітинних мембран;
- енергетична функція – ліпіди є більш відновленими сполуками, ніж білки та вуглеводи, тому якщо при повному окисненні 1 г вуглеводів виділяється приблизно 17,6 кДж енергії (4,2 ккал), а білків – 18 кДж (4,3 ккал), то при повному окисненні 1 г ліпідів – 39,8 кДж (9,5 ккал);
- запасна функція – завдяки високій калорійності та нерозчинності у воді ліпіди є ідеальними резервними носіями енергії;
- бар'єрна функція – ліпіди ізолюють клітину від оточуючого середовища та за рахунок гідрофобних властивостей забезпечують формування мембранних потенціалів;
- каталітична функція – хінони та інші молекули ліпідної природи відіграють роль кофакторів ферментів;
- регуляторна функція – молекули ліпідів чи їх похідних беруть участь у передачі внутрішньоклітинних та міжклітинних сигналів.

Ліпіди, виділені з мікроводоростей, у лабораторних умовах проявляють численні фармакологічно значущі ефекти. Різні їх класи здатні пригнічувати виникнення й ріст новоутворень, гальмувати розмноження вірусу імунodefіциту людини, мають потужну протизапальну дію, стимулюють агрегацію тромбоцитів чи, навпаки, інгібують її (табл. 5.2). Хоча зараз розробки в цій галузі знаходяться на стадії експериментів на тваринах, подальші дослідження в цьому напрямку здаються дуже перспективними, адже подібні ліпіди є невід'ємною складовою рослинної біомаси і, отже, нетоксичні для людини.

Для природних гліцероліпідів властиве існування різних молекулярних форм. Кожен гліцероліпід, виділений з живого організму, є не індивідуальною речовиною, а сумішшю речовин, молекули яких містять одну й ту ж полярну частину і різні ацильні (жирнокислотні) ланцюги.

Таблиця 5.2. Фармакологічна дія ліпідів мікроводоростей

Продуцент	Тип ліпідів	Особливості дії речовин і/або їх складу	Посилання
<i>Протипухлинна активність</i>			
<i>Phormidium tenue</i> (Cyanophyta)	Гліколіпіди	ДГДГ і МГДГ більш активно пригнічують розвиток пухлин, ніж СХДГ. Найбільшу активність проявляють молекулярні види ДГДГ, у яких гідроксильна група в <i>sn</i> -2 положенні гліцеролу естерифікована міристиновою кислотою.	Shirahashi et al., 1993
<i>Chlorella vulgaris</i> (Chlorophyta)	Галактоліпіди	Виникненню пухлин найкраще запобігає МГДГ, який містить залишок 16:2n-6 у <i>sn</i> -2 положенні гліцеролу.	Morimoto et al., 1995
<i>Anabaena flos-aquae</i> f. <i>flos-aquae</i> (Cyanophyta)	6'- <i>O</i> -ацил-моногалактозил-моноацилгліцерол	Речовина є похідною МГДГ – 1- <i>O</i> -ацил-3- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -ацил-β-D-галактопіранозил)- <i>sn</i> -гліцеролом. Наявність залишку 16:1n-7 у <i>sn</i> -1 положенні гліцеролу сприяє підвищенню активності.	Shirahashi et al., 1996
<i>Phormidium tenue</i> (Cyanophyta)	Дигалактозил-діацилгліцероли	Навіть попередня обробка ДГДГ ефективно пригнічує виникнення папілом.	Tokuda et al., 1996
<i>Porphyridium cruentum</i> (Rhodophyta)	Сульфоліпіди	Мають хемопревентивний (пригнічують утворення супероксид-аніона) і хемотерапевтичний (гальмують проліферацію деяких ракових клітин людини) потенціал. Містять 26,1 % 16:0, 36,8 % 20:4n-6, 16,6 % 20:5n-3 і 10,5 % 16:1n-9. Інгібують α-полімеразу ДНК сильніше, ніж рослинний СХДГ.	Bergé et al., 2002
<i>Противірусна активність у відношенні ВІЛ</i>			
Cyanophyta	Сульфоліпіди	Захисний ефект проявляється при концентрації СХДГ 1-100 мкг/мл і практично не залежить від його жирнокислотного складу.	Gustafson et al., 1989
Cyanophyta: <i>Scytonema</i> sp. <i>Oscillatoria raoi</i> <i>Phormidium tenue</i> <i>O. trichoides</i> <i>O. limnetica</i>	Сульфоліпіди Частково деацильований ДГДГ Гліколіпіди	Пригнічують активність зворотної транскриптази вірусу.	Reshef et al., 1997

Продовження табл. 5.2

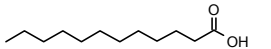
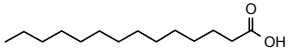
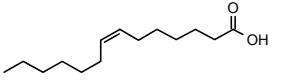
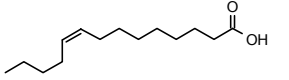
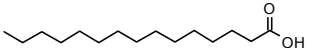
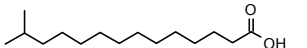
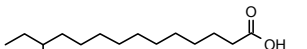
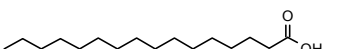
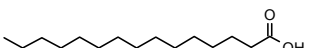
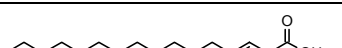
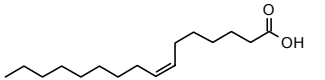
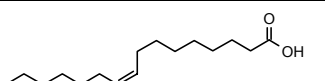
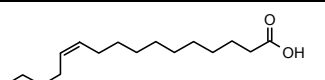
Продуцент	Тип ліпідів	Особливості дії речовин і/або їх складу	Посилання
<i>Противірусна активність у відношенні ВІЛ</i>			
Cyanophyta	Сульфоліпіди	СХДГ ефективно і селективно інгібує лише ДНК-полімеразну активність зворотної транскриптази ВІЛ-1, проте не її рибонуклеазну функцію. IC ₅₀ = 24 нМ. І залишок сульфоновної кислоти, і бічні ланцюги естерів жирних кислот важливі для ефекту інгібування.	Loya et al., 1998
<i>Протизапальна дія, зменшення набряків</i>			
<i>Phormidium</i> sp. ETS-05 (Cyanophyta)	Гліколіпіди	Ступінь прояву ефекту залежить від дози. Протизапальні властивості зростають у ряду індометацин – СХДГ – ДГДГ – МГДГ. Гліколіпіди є менш токсичними, ніж індометацин. МГДГ діє сильніше, ніж поширений протизапальний препарат – бетаметазон-17,21-дипропіонат. Ефект МГДГ тим більший, чим вище ступінь ненасиченості його ацильних залишків.	Bruno et al., 2005
<i>Пригнічення агрегації тромбоцитів</i>			
<i>Oscillatoria rosea</i> (Cyanophyta)	Моногалактозил-моноацилгліцерол	Речовина є похідною МГДГ, в якій немає залишку жирної кислоти в <i>sn</i> -2 положенні гліцеролу, а гідроксильна група в <i>sn</i> -1 положенні естерифікована пальмітиновою кислотою.	Rho et al., 1996
<i>Scytonema julianum</i> (Cyanophyta)	Фосфоглікоацилсфінгозин		Antonopoulou et al., 2005a
<i>Chroococcidiopsis</i> sp. (Cyanophyta)	Фосфоглікоцерамід, фосфоацетилгліко-дигліцерид		Antonopoulou et al., 2005b
<i>Індукція агрегації тромбоцитів</i>			
<i>Scytonema julianum</i> (Cyanophyta)	Ацетилсфінгомелін, ацил-ацетилгліцерол-фосфо-ацетильований гліколіпід		Antonopoulou et al., 2002
<i>Scytonema julianum</i> (Cyanophyta)	Фосфоглікоацил-ацетилсфінгозин, гліко-фосфатидилгліцерол		Antonopoulou et al., 2005a
<i>Chroococcidiopsis</i> sp. (Cyanophyta)	Фосфоацетилглікоцерамід		Antonopoulou et al., 2005b

Природа залишків жирних кислот, що входять до складу гліцероліпідів мікроводоростей, є надзвичайно важливою як для виконання ліпідами їх функцій, так і для комерційного застосування водоростей. З точки зору жирнокислотного складу, водорості є об'єктами з унікальним біотехнологічним потенціалом. Якщо до складу ліпідів вищих рослин входить переважно невелика кількість жирних кислот (до 7-8), то мікроводорості часто мають набагато різноманітніший набір насичених і ненасичених вищих карбонових кислот з довжиною ланцюга від 12 до 28 атомів вуглецю (табл. 5.3), серед яких велику цінність представляють необхідні для підтримання життєдіяльності тварин і людини довголанцюгові поліненасичені жирні кислоти n-3- і n-6-родин (так звані ω 3- і ω 6-кислоти).

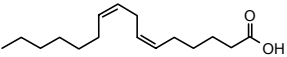
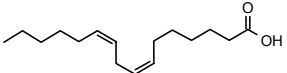
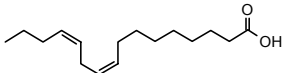
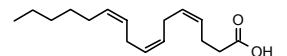
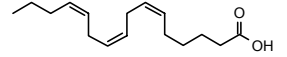
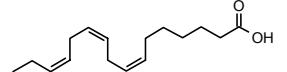
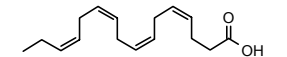
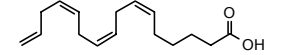
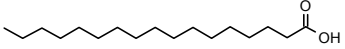
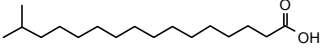
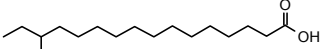
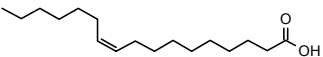
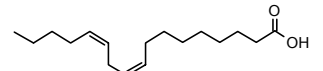
Насичені і ненасичені жирні кислоти значно відрізняються за конфігурацією. У насичених кислотах вуглеводневий ланцюг може приймати безліч конформацій завдяки повній свободі обертання навколо кожного окремого зв'язку. Однак найбільш вірогідною є енергетично вигідніша витягнута форма. У ненасичених кислотах неможливе обертання навколо подвійних зв'язків, що обумовлює жорсткий перегин вуглеводневого ланцюга. У природних жирних кислотах *цис*-конфігурація подвійного зв'язку приводить до перегину аліфатичного ланцюга під кутом приблизно 30°; у випадку *транс*-конфігурації подвійного зв'язку конформація вуглеводневого ланцюга мало відрізняється від конформації насичених ланцюгів (Біохімія червоних водоростей, 2007). У жирних кислотах з подвійними зв'язками їх *цис*-конфігурація надає вуглеводневому ланцюгу вигнутого та скороченого вигляду. Такі структурні властивості ланцюгів жирних кислот мають велике біологічне значення, особливо по відношенню до ліпідів мембран, оскільки відомо, що ненасичені жирні кислоти забезпечують високу плинність, гнучкість і вибірну проникність мембранного бішару.

Головною насиченою кислотою ліпідів мікроводоростей у деяких випадках може бути міристинова, проте в більшості видів нею є пальмітинова кислота (Harwood, 1998; Басова, 2005). Ліпідам водоростей здебільшого притаманний високий вміст ненасичених жирних кислот, які можуть мати від 1 до 6 (інколи до 8) подвійних зв'язків. При порівнянні з вищими рослинами увагу привертає наявність у водоростей тетраєнових C_{16} і C_{18} кислот і γ -ліноленової кислоти (а не лише характерної для вищих рослин α -ліноленової). Довголанцюгові жирні кислоти (C_{20} та C_{22} , інколи довші) зустрічаються в основному в галотолерантних видів і переважно є високоненасиченими (Harwood, 1998). Жирні кислоти з непарним числом атомів вуглецю (наприклад, 15:0, 17:0, 17:2n-5) і розгалужені жирні кислоти (ізостеаринова та інші) можуть зустрічатися в окремих видів водоростей як мінорні компоненти.

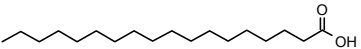
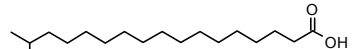
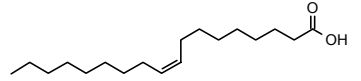
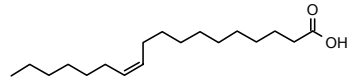
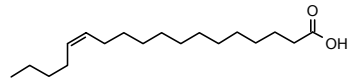
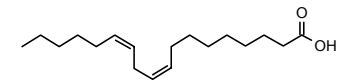
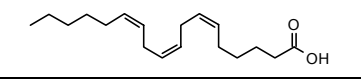
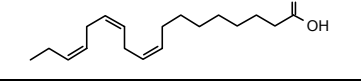
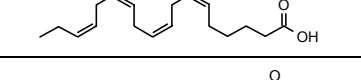
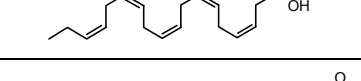
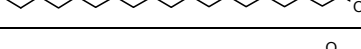
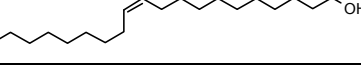
Таблиця 5.3. Жирні кислоти мікробіодоростей

Позначення*	Формула	Систематична назва	Тривіальна назва, прийняті скорочення	Температура плавлення, °С**
12:0		Додеканова	Лауринова	44,2
14:0		Тетрадеканова	Міристинова	53,9
14:1n-7		<i>цис</i> -7-Тетрадеценова		
14:1n-5		<i>цис</i> -9-Тетрадеценова	Міристоолеїнова	-4
15:0		Пентадеканова		52,3
<i>iso</i> -15:0		13-Метилтетрадеканова		52,2
<i>anteiso</i> -15:0		12-Метилтетрадеканова		25,8
16:0		Гексадеканова	Пальмітинова	63,1
<i>iso</i> -16:0		14-Метилпентадеканова	Ізопальмітинова	62,4
16:1n-13 <i>trans</i>		<i>транс</i> -3-Гексадеценова		
16:1n-9		<i>цис</i> -7-Гексадеценова		21/33/32-33 (α-форма), 40-41 (β-форма)
16:1n-7		<i>цис</i> -9-Гексадеценова	Пальмітоолеїнова	-0,5 ÷ 0,5
16:1n-5		<i>цис</i> -11-Гексадеценова		

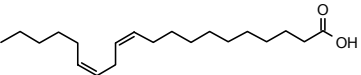
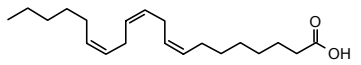
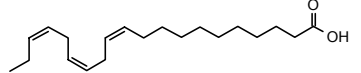
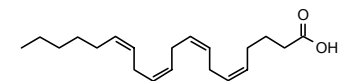
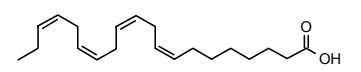
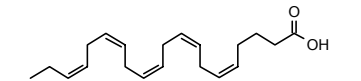
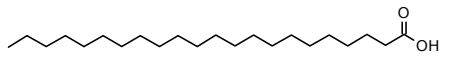
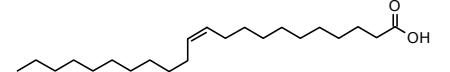
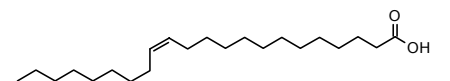
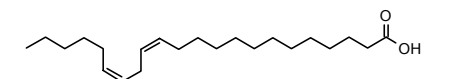
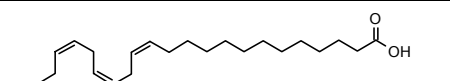
Продовження табл. 5.3

Позначення*	Формула	Систематична назва	Тривіальна назва, прийняті скорочення	Температура плавлення, °С**
16:2n-7		<i>цис</i> -6, <i>цис</i> -9-Гексадекадієнова		
16:2n-6		<i>цис</i> -7, <i>цис</i> -10-Гексадекадієнова		
16:2n-4		<i>цис</i> -9, <i>цис</i> -12-Гексадекадієнова		
16:3n-6		<i>цис</i> -4, <i>цис</i> -7, <i>цис</i> -10-Гексадекатриєнова		
16:3n-4		<i>цис</i> -6, <i>цис</i> -9, <i>цис</i> -12-Гексадекатриєнова		
16:3n-3		<i>цис</i> -7, <i>цис</i> -10, <i>цис</i> -13-Гексадекатриєнова		
16:4n-3		<i>цис</i> -4, <i>цис</i> -7, <i>цис</i> -10, <i>цис</i> -13-Гексадекатетраєнова		
16:4n-1		<i>цис</i> -6, <i>цис</i> -9, <i>цис</i> -12, <i>цис</i> -15-Гексадекатетраєнова		
17:0		Гептадеканова	Маргарінова	61,3
<i>iso</i> -17:0		15-Метилгексадеканова		60,5
<i>anteiso</i> -17:0		14-Метилгексадеканова		38,0
17:1n-7		<i>цис</i> -10-Гептадеєнова		
17:2n-5		<i>цис</i> -9, <i>цис</i> -12-Гептадекадієнова		

Продовження табл. 5.3

Позначення*	Формула	Систематична назва	Тривіальна назва, прийняті скорочення	Температура плавлення, °С**
18:0		Октадеканова	Стеаринова	69,6
iso-18:0		16-Метилгептадеканова	Ізостеаринова	69,5
18:1n-9		цис-9-Октадеценова	Олеїнова	12 (лабільна), 16 (стабільна)
18:1n-7		цис-11-Октадеценова	цис-Вакценова (Асклепієва)	14,5 ÷ 15,5
18:1n-5		цис-13-Октадеценова		
18:2n-6		цис-9, цис-12-Октадекадієнова	Лінолева, ЛК, LA	-5
18:3n-6		цис-6, цис-9, цис-12-Октадекатриєнова	γ-Ліноленова, ГЛК, GLA	-11,3 ÷ -11
18:3n-3		цис-9, цис-12, цис-15-Октадекатриєнова	α-Ліноленова, АЛК, ALA	-11,3 ÷ -11
18:4n-3		цис-6, цис-9, цис-12, цис-15-Октадекатетраєнова	Стеаридонова (Мороктова, моротова)	-57,4 ÷ -56,6
18:5n-3		цис-3, цис-6, цис-9, цис-12, цис-15-Октадекапентаєнова		
20:0		Ейкозанова	Арахінова	76,5 ÷ 77
20:1n-9		цис-11-Ейкозенова	Гондоїнова	23-24/50

Продовження табл. 5.3

Позначення*	Формула	Систематична назва	Тривіальна назва, прийняті скорочення	Температура плавлення, °С**
20:2n-6		<i>цис</i> -11, <i>цис</i> -14-Ейкозадієнова	Дигомолінолева	
20:3n-6		<i>цис</i> -8, <i>цис</i> -11, <i>цис</i> -14-Ейкозатриєнова	Дигомо-γ-ліноленова	
20:3n-3		<i>цис</i> -11, <i>цис</i> -14, <i>цис</i> -17-Ейкозатриєнова		
20:4n-6		<i>цис</i> -5, <i>цис</i> -8, <i>цис</i> -11, <i>цис</i> -14-Ейкозатетраєнова	Арахідонова, АК, АА, АРА	-49,5
20:4n-3		<i>цис</i> -8, <i>цис</i> -11, <i>цис</i> -14, <i>цис</i> -17-Ейкозатетраєнова	ω3-Арахідонова	
20:5n-3		<i>цис</i> -5, <i>цис</i> -8, <i>цис</i> -11, <i>цис</i> -14, <i>цис</i> -17-Ейкозапентаєнова	Тимнодонова, ЕПК, ЕРА	-54,4 ÷ -53,8
22:0		Докозанова	Бегенова	81,5
22:1n-11		<i>цис</i> -11-Докозенова	Цетолейнова	33 ÷ 33,7
22:1n-9		<i>цис</i> -13-Докозенова	Ерукова	34,7
22:2n-6		<i>цис</i> -13, <i>цис</i> -16-Докозадієнова		
22:3n-3		<i>цис</i> -13, <i>цис</i> -16, <i>цис</i> -19-Докозатриєнова		

Продовження табл. 5.3

Позначення*	Формула	Систематична назва	Тривіальна назва, прийняті скорочення	Температура плавлення, °С**
22:4n-3		<i>цис</i> -10, <i>цис</i> -13, <i>цис</i> -16, <i>цис</i> -19-Докозатетраєнова		
22:5n-6		<i>цис</i> -4, <i>цис</i> -7, <i>цис</i> -10, <i>цис</i> -13, <i>цис</i> -16-Докозапентаєнова	Кислота Осбонда	
22:5n-3		<i>цис</i> -7, <i>цис</i> -10, <i>цис</i> -13, <i>цис</i> -16, <i>цис</i> -19-Докозапентаєнова	Клупанодонова (Клупадонова), ДПК, DPA	
22:6n-3		<i>цис</i> -4, <i>цис</i> -7, <i>цис</i> -10, <i>цис</i> -13, <i>цис</i> -16, <i>цис</i> -19-Докозагексаєнова	Цервонова, ДГК, DHA	-44,2 ÷ -44,1
24:0		Тетракозанова	Лігноцеринова	87,5 ÷ 88,0
24:5n-6		<i>цис</i> -6, <i>цис</i> -9, <i>цис</i> -12, <i>цис</i> -15, <i>цис</i> -18-Тетракозапентаєнова		
24:6n-3		<i>цис</i> -6, <i>цис</i> -9, <i>цис</i> -12, <i>цис</i> -15, <i>цис</i> -18, <i>цис</i> -21-Тетракозагексаєнова	Нісинова	
26:7n-3		<i>цис</i> -5, <i>цис</i> -8, <i>цис</i> -11, <i>цис</i> -14, <i>цис</i> -17, <i>цис</i> -20, <i>цис</i> -23-Гексакозагептаєнова		
28:7n-6		<i>цис</i> -4, <i>цис</i> -7, <i>цис</i> -10, <i>цис</i> -13, <i>цис</i> -16, <i>цис</i> -19, <i>цис</i> -22-Октакозагептаєнова		
28:8n-3		<i>цис</i> -4, <i>цис</i> -7, <i>цис</i> -10, <i>цис</i> -13, <i>цис</i> -16, <i>цис</i> -19, <i>цис</i> -22, <i>цис</i> -25-Октакозаоктаєнова		

* Жирні кислоти звичайно характеризують двома числами, розділеними двокрапкою. Число перед двокрапкою позначає кількість атомів вуглецю, а число після двокрапки – кількість подвійних зв'язків. Коли положення подвійних зв'язків відоме, його позначають, починаючи відлік з карбоксильної групи (після символу Δ) або з метильного кінця ланцюга (одним числом після позначення "n-", раніше використовували символ ω); для поліненасичених жирних кислот застосування останнього способу можна вважати коректним, лише якщо подвійні зв'язки є метиленрозділеними.

** За даними сайту www.lipidbank.jp

Прісноводні водорості найчастіше містять ті ж самі жирні кислоти, що й вищі рослини, проте в інших співвідношеннях (Harwood, 1998). Більшість жирних кислот у цих водоростей зазвичай є нерозгалуженими, з парним числом атомів вуглецю – від 14 до 18. Для прісноводних водоростей характерні вищий вміст C_{16} жирних кислот і нижчий – C_{18} кислот (особливо α -ліноленової), ніж у листі вищих рослин. Морські ж види переважно відзначаються набагато ширшим спектром жирних кислот, ніж прісноводні водорості; помітною їх ознакою є велика кількість відмінних від α -ліноленової кислоти полієнових жирних кислот (Harwood, 1998; Басова, 2005).

Жирнокислотний склад мікроводоростей значною мірою залежить від їх таксономічного положення (табл. 5.4). Так, кількісно головною жирною кислотою прокаріотичних синьозелених водоростей (ціанобактерій) є пальмітинова (16:0). Довжина ацильних ланцюгів у гліцероліпідах синьозелених водоростей не перевищує 18 атомів вуглецю, у цієї групи організмів також не було знайдено *транс*-3-гексадеценову кислоту, властиву для фосфатидилгліцеролу хлоропластів еукаріот. На основі жирнокислотного складу синьозелені водорості поділяють на 4 групи (Wada, Murata, 1998). Штами першої групи містять лише насичені та моноєнові жирні кислоти, а трьох інших – ще й полієнові: другої – α -ліноленову (18:3n-3) і лінолеву (18:2n-6), третьої – γ -ліноленову (18:3n-6) і лінолеву, четвертої – стеаридонову (18:4n-3), обидва види ліноленової та лінолеву.

Якісний і кількісний склад жирних кислот еукаріотичних водоростей є надзвичайно різноманітним. У динофітових водоростей переважають 16:0, 18:4n-3, 20:5n-3 і 22:6n-3 кислоти; у деяких динофлагелят до 43 % усіх жирних кислот може складати 18:5n-3. КRYPTOфітові водорості містять жирні кислоти в діапазоні від C_{12} до C_{22} , але здебільшого – у дуже малій кількості (Behrens, Kyle, 1996). Для примнезієвих водоростей також характерний широкий спектр жирних кислот від C_{14} до C_{22} ; деякі види і штами, подібно до динофітових, є багатими на ейкозапентаєнову, докозагексаєнову чи стеаридонову кислоти. В евгленових навіть якісний склад жирних кислот значною мірою залежить від типу живлення (Regnault et al., 1995). Культури, що фотосинтезують, містять жирні кислоти від C_{14} до C_{22} з переважанням C_{16} і C_{18} кислот, а гетеротрофні – переважно 14:0, 16:0 і 18:1 кислоти. До типових жирних кислот діатомових та еустигматофітових водоростей відносяться міристинова, пальмітинова, пальмітоолеїнова та ейкозапентаєнова; при цьому вміст C_{18} кислот здебільшого є низьким. Червоні водорості багаті на ненасичені довголанцюгові жирні кислоти, головним чином C_{20} – ейкозапентаєнову та арахідонову. Зелені водорості здебільшого мають подібний до вищих рослин та олійних дріжджів жирнокислотний склад – з домінуванням C_{16} і C_{18} кислот, як насичених, так і ненасичених (Behrens, Kyle, 1996).

Таблиця 5.4. Головні жирні кислоти мікроводоростей різних систематичних груп (з використанням даних сайту lipid.narod.ru – Лабораторії Морських Ліпідів, Владивосток, Росія)

Головні жирні кислоти*	Рід	Примітки	Посилання
Cyanophyta			
16:0, 16:1n-9, 18:2n-6, 18:3n-3		<i>Spirulina</i> : 18:3n-6 Жирні кислоти не довше 18 атомів вуглецю	Allen et al., 1970
16:0	<i>Anabaena</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Spirulina</i>	<i>Spirulina</i> : 18:3n-6 <i>Nostoc</i> : 18:1n-9 Більшість видів <i>Microcystis</i> : 18:4n-3 <i>Nostoc</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Spirulina</i> , <i>Anabaena</i> : 16:1n-7, 18:2n-6 <i>Oscillatoria</i> , <i>Microcystis</i> : 18:3n-3	Ahlgren et al., 1992
16:0	<i>Anabaena</i> , <i>Mastigocladus</i> , <i>Spirulina</i> , <i>Synechococcus</i> , <i>Synechocystis</i> , <i>Tolypothrix</i>	<i>Mastigocladus</i> , <i>Synechococcus</i> , <i>Anabaena</i> : 16:1n-7, 18:1n-9 <i>Spirulina</i> , <i>Synechocystis</i> , <i>Tolypothrix</i> : 18:3n-6 <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002, <i>Anabaena</i> , <i>Spirulina</i> , <i>Synechocystis</i> : 18:2n-6 <i>Anabaena</i> , <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002, <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803, <i>Tolypothrix</i> : 18:3n-3 <i>Tolypothrix</i> , <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803: 18:4n-3	Murata et al., 1992
16:0	<i>Agmenellum</i> , <i>Anacystis</i> , <i>Synechocystis</i>	<i>Agmenellum</i> : 18:3n-3, 16:2n-6 <i>Anacystis</i> , <i>Synechocystis</i> : 16:1n-9, 14:0	Viso, Marty, 1993
16:0	<i>Chroococcus</i> , <i>Synechococcus</i>	<i>Chroococcus</i> : 18:2n-6, 12:0 <i>Synechococcus</i> : 16:1, 14:0	Patil et al., 2007

Продовження табл. 5.4

Головні жирні кислоти*	Рід	Примітки	Посилання
<i>Dinophyta</i>			
16:0, 22:6n-3, 18:1n-9	<i>Peridinium</i>		Cranwell et al., 1985
22:6, 16:0, 18:4, 20:5	<i>Amphidinium</i>		Harwood, Jones, 1989
16:0, 18:1n-9, 22:6n-3, 14:0	<i>Scrippsiella</i>		Bradshaw et al., 1991
16:0, 18:1n-9, 14:0	<i>Peridinium</i> , <i>Peridinopsis</i>	У деяких видів: 22:6n-3 – до 14,9 % 20:5n-3 – до 10,6 %,	Ahlgren et al., 1992
16:0	<i>Amphidinium</i> , <i>Prorocentrum</i> , <i>Scrippsiella</i>	<i>Amphidinium</i> : 22:6n-3, 20:5n-3 <i>Amphidinium</i> , <i>Scrippsiella</i> : 18:0, 18:1n-9 <i>Scrippsiella</i> , <i>Prorocentrum</i> : 14:0	Viso, Marty, 1993
16:0, 18:4n-3, 14:0, 22:6n-3, 18:0, 18:3n-3	<i>Gymnodinium</i>		Zhukova, Aizdaicher, 1995
18:5n-3, 22:6n-3, 16:0, 18:4n-3	<i>Prorocentrum</i>		Mansour et al., 1999a
22:6n-3, 16:0, 18:5n-3	<i>Fragilidium</i> , <i>Gymnodinium</i> , <i>Scrippsiella</i> , <i>Symbiodinium</i>	<i>Symbiodinium</i> : 16:1n-7 <i>Fragilidium</i> , <i>Symbiodinium</i> , <i>Gymnodinium</i> : 20:5n-3 <i>Symbiodinium</i> , <i>Scrippsiella</i> , <i>Fragilidium</i> : 18:4n-3	Mansour et al., 1999b
18:4n-3, 22:6n-3, 16:0	<i>Amphidinium</i> , <i>Heterocapsa</i>	<i>Amphidinium</i> : 20:5n-3 <i>Heterocapsa</i> : 18:5n-3, 14:0	Mansour et al., 2005
<i>Cryptophyta</i>			
16:0, 18:3n-3, 18:4n-3, 20:5n-3			Beach et al., 1970
18:4, 20:5, 16:0, 18:3	<i>Hemiselmis</i>		Harwood, Jones, 1989
16:0, 18:4n-3, 18:3n-3, 20:5n-3	<i>Cryptomonas</i> , <i>Rhodomonas</i>		Ahlgren et al., 1992
16:0, 18:2n-6, 18:1n-9, 18:4n-3	<i>Chroomonas</i> , <i>Rhodomonas</i>		Viso, Marty, 1993
18:4n-3, 16:0, 20:5n-3, 18:3n-3, 22:6n-3	<i>Chroomonas</i>		Zhukova, Aizdaicher, 1995
18:4n-3, 18:3n-3, 16:0, 20:5n-3	<i>Cryptomonas</i> , <i>Rhodomonas</i>	<i>Cryptomonas</i> : 22:6n-3 <i>Rhodomonas</i> : 14:0	Renaud et al., 1999
18:3n-3, 16:0, 18:4n-3, 22:6n-3	<i>Proteomonas</i> , <i>Rhodomonas</i>	<i>Rhodomonas</i> : 20:5n-3	Mansour et al., 2005
18:3n-3, 18:2n-6, 16:0, 18:1n-9	<i>Oocystis</i> , <i>Rhodomonas</i>	<i>Rhodomonas</i> : 18:4n-3, 20:5n-3, 14:0, 24:0	Patil et al., 2007

Продовження табл. 5.4

Головні жирні кислоти*	Рід	Примітки	Посилання
<i>Raphidophyta</i>			
20:5, 18:4, 16:0, 16:1, 14:0, 18:3	<i>Olisthodiscus</i>		Harwood, Jones, 1989
16:0, 16:1n-7, 20:5n-3, 18:4n-3, 14:0	<i>Heterosigma</i>		Viso, Marty, 1993
16:0, 20:5n-3, 18:4n-3, 18:5n-3	<i>Heterosigma</i>		Bell et al., 1997
<i>Chrysophyta</i>			
16:0, 16:1, 18:1, 20:5n-3			Nichols, Appleby, 1969
16:0, 18:4n-3, 15:0	<i>Chromulina</i>		Ahlgren et al., 1992
<i>Prymnesiophyta</i>			
16:0, 16:1n-7, 18:1n-9, 18:2n-6, 18:3n-3			Cobelas, Lechado, 1989
16:1, 16:0, 22:6	<i>Isochrysis</i> , <i>Monochrysis</i>	<i>Isochrysis</i> : 18:3, 16:4, 18:2 <i>Monochrysis</i> : 20:5, 14:0, 16:3	Harwood, Jones, 1989
16:0	<i>Chrysotila</i> , <i>Emiliana</i> , <i>Hymenomonas</i> , <i>Pavlova</i>	<i>Pavlova</i> , <i>Emiliana</i> , <i>Chrysotila</i> : 14:0 <i>Chrysotila</i> , <i>Emiliana</i> , <i>Hymenomonas</i> : 18:1n-9 <i>C. stipitata</i> : 18:0 <i>Hymenomonas</i> : 18:2n-6, 18:4n-3, 15:0, 16:1n-9 <i>Pavlova</i> : 16:1n-7 <i>Emiliana</i> : 18:1n-7	Viso, Marty, 1993
18:4n-3, 14:0, 18:3n-3, 22:6n-3, 16:0, 18:1n-9, 18:2n-6	<i>Isochrysis</i>		Servel et al., 1994
16:1n-7, 20:5n-3, 16:0, 14:0	<i>Pavlova</i>		Zhukova, Aizdaicher, 1995
18:4n-3, 14:0, 16:0, 18:5n-3, 22:6n-3, 18:1n-9, 18:3n-3	<i>Isochrysis</i>		Renaud et al., 1999
20:5n-3, 16:1n-7, 16:0, 14:0	<i>Isochrysis</i>		Bandarra et al., 2003
20:5n-3, 14:0, 18:4n-3, 16:1n-7, 16:0, 22:6n-3	<i>Pavlova</i>		Mansour et al., 2005
22:6n-3, 16:0, 18:4n-3, 14:0	<i>Isochrysis</i> , <i>Pavlova</i>	<i>Pavlova</i> : 20:5n-3, 16:1 <i>Isochrysis</i> : 18:1n-9, 18:2n-6	Patil et al., 2007

Продовження табл. 5.4

Головні жирні кислоти*	Рід	Примітки	Посилання
Bacillariophyta			
16:0, 16:1n-7, 20:5n-3, 14:0, 18:1n-9			Brockerhoff et al., 1964
16:1, 16:3, 16:0, 14:0	<i>Lauderia</i>		Harwood, Jones, 1989
16:1n-7, 16:0, 14:0	<i>Asterionella</i> , <i>Chaetoceros</i> , <i>Nitzschia</i> , <i>Phaeodactylum</i> , <i>Thalassiosira</i>	<i>Phaeodactylum</i> : 20:5n-3	Viso, Marty, 1993
20:5n-3, 16:1n-7, 16:0, 14:0	<i>Chaetoceros</i> , <i>Skeletonema</i>	<i>Skeletonema</i> : 22:6n-3	Servel et al., 1994
16:1n-7, 20:5n-3, 16:0, 14:0, 16:3n-4	<i>Chaetoceros</i> , <i>Phaeodactylum</i> , <i>Skeletonema</i>	<i>Skeletonema</i> : 16:4n-1	Zhukova, Aizdaicher, 1995
14:0, 16:0, 16:1n-7, 20:5n-3	<i>Chaetoceros</i> , <i>Thalassiosira</i>	Дані по планктону, в якому вказані види склали до 75 % біомаси	Hayakawa et al., 1997
20:5n-3, 16:1n-7, 16:0, 16:4n-1	<i>Phaeodactylum</i>		Medina et al., 1998
20:5n-3, 16:4n-1, 16:3n-4, 16:1n-7	<i>Skeletonema</i>		Piveteau et al., 1999
16:1n-7, 16:0, 20:5n-3	<i>Amphora</i> , <i>Chaetoceros</i> , <i>Fragilaria</i> , <i>Nitzschia</i> , <i>Skeletonema</i>	Усі, крім <i>Fragilaria</i> : 14:0 Усі, крім <i>Amphora</i> : 16:3n-4 <i>Fragilaria</i> , <i>Nitzschia</i> : 20:4n-6 <i>Chaetoceros</i> , <i>Amphora</i> : 16:2n-7	Renaud et al., 1999
20:5n-3, 16:3n-4, 16:1n-7	<i>Skeletonema</i>		Viron et al., 2000
16:1n-7, 20:5n-3	<i>Navicula</i> , <i>Skeletonema</i> , <i>Thalassiosira</i>	<i>Thalassiosira</i> , <i>Navicula</i> : 16:0 <i>Skeletonema</i> : 14:0, 16:3n-4	Mansour et al., 2005
20:5n-3, 16:1, 16:0, 14:0	<i>Phaeodactylum</i>		Patil et al., 2007
Xanthophyta			
14:0, 16:0, 16:1n-7, 16:3n-3, 20:5n-3			Nichols, Appleby, 1969
Xanthophyceae			
16:1n-7, 16:0	<i>Heterothrix</i>		Viso, Marty, 1993
16:1, 20:5n-3, 16:0, 14:0	<i>Tribonema</i>		Patil et al., 2007

Продовження табл. 5.4

Головні жирні кислоти*	Рід	Примітки	Посилання
<i>Eustigmatophyceae</i>			
16:1, 20:4, 16:0, 18:1	<i>Nannochloropsis</i>		Suen et al., 1987
16:0, 20:5n-3, 16:1n-7, 14:0	<i>Nannochloropsis</i>		Servel et al., 1994
20:5n-3, 16:1n-7, 16:0	<i>Nannochloropsis</i>		Zhukova, Aizdaicher, 1995
20:5n-3, 16:1, 16:0, 14:0, 18:2n-6	<i>Nannochloropsis</i>		Patil et al., 2007
<i>Rhodophyta</i>			
16:0, 18:2n-6, 20:5n-3			Cobelas, Lechado, 1989
16:0, 20:4n-6, 20:5n-3, 18:3n-3	<i>Porphyridium</i>		Viso, Marty, 1993
16:0, 20:5n-3, 20:4n-6	<i>Porphyridium</i>		Servel et al., 1994
16:0, 20:4n-6, 20:5n-3, 18:2n-6	<i>Porphyridium</i>		Zhukova, Aizdaicher, 1995
16:0, 20:5n-3, 20:4n-6, 18:2n-6	<i>Porphyridium</i>		Medina et al., 1998
16:0, 18:3n-3, 18:1n-9, 18:2n-6, 20:5n-3, 12:0	<i>Rhodorus</i>		Renaud et al., 1999
20:5n-3, 20:4n-6, 16:0, 18:2n-6	<i>Porphyridium</i>		Patil et al., 2007
<i>Chlorophyta</i>			
16:0, 18:1n-7, 18:2n-6, 18:3n-3, 18:3n-6			Rězanka et al., 1983

Продовження табл. 5.4

Головні жирні кислоти*	Рід	Примітки	Посилання
<i>Chlorophyceae</i>			
16:0	<i>Ankistrodesmus</i> , <i>Chlamydomonas</i> , <i>Chlorella</i> , <i>Dunaliella</i> , <i>Nannochloris</i> , <i>Scenedesmus</i>	<i>Nannochloris</i> : 20:5: 16:3 Усі, крім <i>Nannochloris</i> : 18:3 Усі, крім <i>Ankistrodesmus</i> і <i>Nannochloris</i> : 18:2 <i>Chlamydomonas</i> , <i>Scenedesmus</i> , <i>Ankistrodesmus</i> : 16:4 <i>Nannochloris</i> , <i>Dunaliella</i> , <i>Chlorella</i> : 16:1 Усі, крім <i>Chlorella</i> і <i>Nannochloris</i> : 18:1 <i>Chlorella</i> , <i>Nannochloris</i> : 16:2	Harwood, Jones, 1989
18:3n-3, 16:0, 18:1n-9, 18:2n-6	<i>Chlamydomonas</i> , <i>Chlorella</i> , <i>Scenedesmus</i>	У деяких видів: <i>iso</i> -18:0 – до 20,8 %	Ahlgren et al., 1992
16:0	<i>Dunaliella</i> , <i>Nannochloris</i>	<i>Dunaliella</i> : 18:3n-3, 16:4n-3, 18:2n-6 <i>Nannochloris</i> : 18:1n-7, 16:1n-9	Viso, Marty, 1993
18:3n-3, 16:0, 18:2n-6	<i>Chlorella</i> , <i>Dunaliella</i>	<i>Dunaliella</i> : 16:4n-3 <i>Chlorella</i> : 16:3n-3, 16:1n-7	Zhukova, Aizdaicher, 1995
20:4n-6, 18:2n-6, 18:1n-9, 16:0	<i>Parietochloris</i>		Khozin-Goldberg et al., 2002
18:1n-9, 16:0, 18:3n-3, 18:2n-6	<i>Pseudokirchneriella</i>		Patil et al., 2007
<i>Prasinophyceae</i>			
16:0, 18:1n-9, 18:3n-3, 20:5n-3			Cobelas, Lechado, 1989
16:0, 18:3n-3, 18:1n-9, 16:4n-3, 18:4n-3	<i>Tetraselmis</i>		Viso, Marty, 1993
16:0, 18:4n-3, 18:3n-3, 16:1n-7	<i>Tetraselmis</i>		Servel et al., 1994
16:4n-3, 16:0, 18:3n-3, 18:4n-3, 20:5n-3	<i>Tetraselmis</i>		Zhukova, Aizdaicher, 1995
16:0, 18:3n-3, 16:4n-3, 18:4n-3, 18:1n-9	<i>Tetraselmis</i>		Caers et al., 1999
16:0, 18:3n-3, 16:4n-3, 18:4n-3	<i>Nephroselmis</i> , <i>Tetraselmis</i>		Renaud et al., 1999
18:1n-9, 18:3n-3, 16:0, 20:5n-3, 18:4n-3	<i>Tetraselmis</i>		Patil et al., 2007

* Жирні кислоти вказані в порядку зменшення їх вмісту в мікроводоростей.

Кілька видів містить багато ейкозапентаєнової кислоти. У представників зелених водоростей дуже високою є активність стеароїл-КоА-десатурази, що приводить до утворення великих кількостей ненасичених C_{18} жирних кислот.

Вміст жирних кислот у межах одного і того ж виду може істотно відрізнятися у різних класів ліпідів. Запасні ліпіди, такі як триацилгліцероли, часто містять набагато менше поліненасичених жирних кислот (ПНЖК), ніж полярні гліцероліпіди (Harwood, 1998). З полярних ліпідів МГДГ звичайно має найвищий ступінь ненасиченості жирнокислотних залишків, а СХДГ – найменший.

На загальну кількість жирних кислот та їх взаємні співвідношення значною мірою впливають фактори оточуючого середовища, наприклад, коливання температури чи голодування по азоту (табл. 5.5). Відсутність або дефіцит азоту в середовищі культивування, зниження температури стимулюють нагромадження ПНЖК. У діатомових водоростей вирішальним для нагромадження n-3 ПНЖК є достатня кількість силікатів у середовищі культивування (Shifrin, Chisholm, 1981; Mortensen et al., 1988). Відомо, що відносний вміст

Таблиця 5.5. Деякі приклади впливу умов культивування водоростей на їх жирнокислотний склад (Behrens, Kyle, 1996)

Фактор, що здійснює вплив	Реакція вмісту жирних кислот	Посилання
Обмеження кількості азоту	Підвищення вмісту жирних кислот	Chelf, 1990; Makrides et al., 1995; Roessler, 1990; Shifrin, Chisholm, 1981; Suen et al., 1987; Tedesco, Duerr, 1989; Tornabene et al., 1983
Надлишок азоту	Зниження вмісту C_{22} кислот	Regnault et al., 1995
Посилене освітлення	Підвищення вмісту жирних кислот	Roessler, 1990; Tedesco, Duerr, 1989; Thompson et al., 1990
Низька температура	Підвищення вмісту ненасичених жирних кислот	Al-Hasan et al., 1991; Mortensen et al., 1988; Nishida, Murata, 1996; Roessler, 1990
Низька температура	Підвищення вмісту 20:5, 22:6	Tatsuzawa, Takizawa, 1995
Mn^{2+}	Підвищення вмісту жирних кислот	Constantopoulos, 1970
Дефіцит кремнію	Підвищення вмісту жирних кислот	Roessler, 1990
Підвищення концентрації CO_2	Підвищення вмісту ненасичених жирних кислот	Tsuzuki et al., 1990
Зниження співвідношення N : P	Підвищення вмісту жирних кислот	Grima et al., 1995
Дефіцит фосфату	Підвищення вмісту жирних кислот	Reitan et al., 1994

ейкозапентаєнної і докозагексаєнної кислот у мікробіодоростей падає при нестачі фосфату (Reitan et al., 1994). Хлорид амонію пригнічує ріст культури *Spirulina platensis*, проте приводить до зростання в ній вмісту γ -ліноленової кислоти (Cohen, 1997).

Як уже згадувалося, під час стаціонарної фази росту в багатьох мікробіодоростей підвищується вміст сумарних ліпідів, особливо триацилгліцеролів. Проте цей процес супроводжується зростанням у ліпідах відносної кількості насичених і мононенасичених жирних кислот і, як наслідок, зниженням вмісту ПНЖК (Басова, 2005). Причиною цього є те, що насичені і моноєннові жирні кислоти дають більше енергії при окисненні, ніж полієнові, і, отже, забезпечують більшу ефективність запасання ліпідів.

Мікробіодорості є основним первинним продуцентом довголанцюгових поліненасичених n-3 жирних кислот, особливо докозагексаєнної (ДГК), у біосфері (Behrens, Kyle, 1996); навіть у морських макрофітів ДГК зустрічається переважно в слідових кількостях (Harwood, 1998). Тому в останні десятиріччя одноклітинні водорості привертають пильну увагу як вагоме джерело незвичайних та цінних ліпідів і жирних кислот.

Позитивний вплив поліненасичених жирних кислот на стан здоров'я є загальновизнаним і широковідомим (Shahidi, Wanasundara, 1998; Horrocks, Yeo, 1999; <http://www.umm.edu/altmed/articles/omega-3-000316.htm>; <http://www.umm.edu/altmed/articles/omega-6-000317.htm>). У першу чергу вживання n-3 ПНЖК – докозагексаєнної (ДГК) та ейкозапентаєнної (ЕПК) – запобігає виникненню і прогресуванню хвороб серцево-судинної системи (рис. 5.4). Жирні кислоти n-3 ряду знижують рівні загального холестеролу і тригліцеридів у плазмі крові, покращують співвідношення між ліпопротеїнами високої і низької щільності. Доведено, що n-3 жирні кислоти зменшують запалення, у той час як більшість n-6 жирних кислот (за винятком γ -ліноленової) стимулюють розвиток запальної реакції. Показана важливість ЕПК і ДГК при лікуванні розсіяного склерозу, деяких видів раку (молочної залози, товстого кишечника, простати), ревматоїдного артрити, інсулінонезалежного цукрового діабету, бронхіальної астми, псоріазу та інших захворювань шкіри, опіків, депресій, порушень уваги, синдрому гіперактивності в дітей та хвороб старечого віку, таких як хвороба Альцгеймера, остеопороз та пов'язана з віком дегенерація жовтої плями (Simopoulos, 1999). Достатнє вживання n-3 жирних кислот під час вагітності знижує ризик передчасних пологів і малої ваги новонародженої дитини.

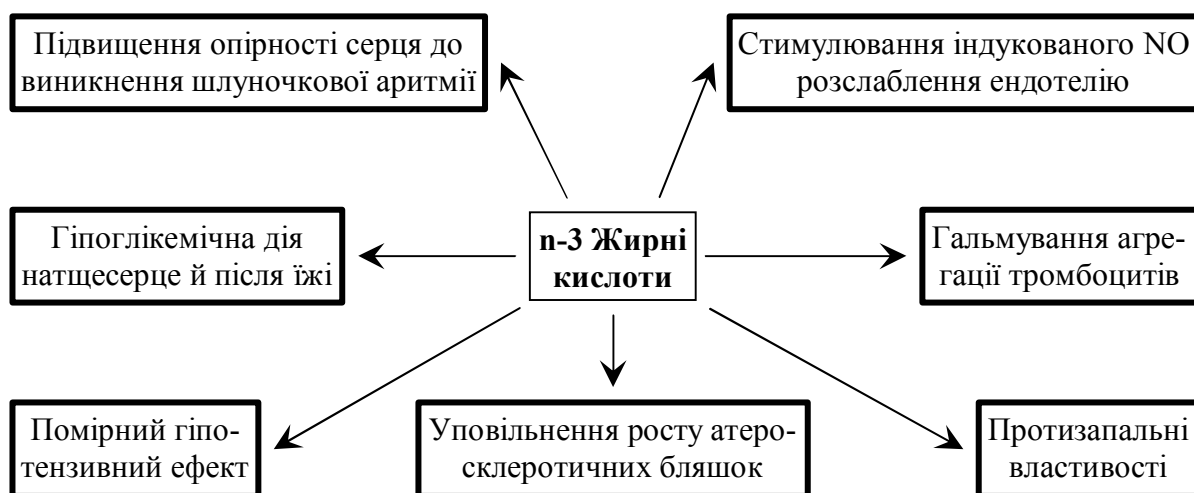


Рис. 5.4. Можливі механізми зниження ризику серцево-судинних хвороб при дії n-3 жирних кислот (Ward, Singh, 2005).

Донедавна вважалося, що для людини і тварин абсолютно незамінними (есенційними) є лише дві ПНЖК: ліолева (ЛК) і α -ліоленова (АЛК) кислоти (Басова, 2005). Арахідонову (АК), ейкозапентаєнову (ЕПК) і докозагексаєнову (ДГК) кислоти відносили до частково незамінних, оскільки вони, хоча і не синтезуються в організмі людини *de novo*, можуть утворюватися за рахунок елонгації та десатурації ЛК та АЛК. Однак пізніше було показано, що масштаби цих реакцій є відносно невеликими (Apt, Behrens, 1999; Burdge, Calder, 2005). Так, ефективність перетворення АЛК на ЕПК становить 2-15 %, а на ДГК – 2-5 % (у жінок ступінь перетворення є трохи вищим, ніж у чоловіків). Тому дуже бажаним є отримання всіх цих сполук з їжею, причому особливо важливим є достатнє надходження n-3 ПНЖК – ДГК і ЕПК. Співвідношення між ДГК, ЕПК і АК у продуктах харчування має більше значення, ніж абсолютний вміст цих кислот (Apt, Behrens, 1999; Simopoulos, 2002). За різними джерелами, оптимальним співвідношенням між n-6 і n-3 жирними кислотами вважають від 1:1 до 4:1. У той же час для типового “західного” раціону характерні співвідношення від 10:1 до 30:1.

За останніми рекомендаціями медичних установ, чоловіки повинні вживати 1,4-1,6 г n-3 ПНЖК на добу, жінки – 1,1 г (Ward, Singh, 2005). З лікувальною метою інколи можливе підвищення дози до 2-4 г n-3 ПНЖК на добу. Вживання ЕПК і ДГК загальною кількістю до 3 г на добу вважається безпечним; помірні побічні ефекти при застосуванні таких доз ПНЖК проявляються рідко. Симптомами дефіциту n-3 жирних кислот в організмі є сильна втома, погіршення пам'яті, сухість шкіри, проблеми з серцево-судинною системою, коливання настрою або депресія, поганий кровообіг.

Сучасні продукти тваринного походження (м'ясо, молоко, яйця) зараз містять набагато менше ДГК, ніж кілька десятиліть тому. Причиною є те, що в раціоні худоби і птиці значно знизилася (в деяких випадках до повної відсутності) частка зелених кормів, а листя рослин є

основним джерелом n-3 α -ліноленової кислоти (АЛК) для травоядних тварин. В їх організмі АЛК перетворюється, хоч і повільно, на ДГК, яка і нагромаджується в тканинах. Корми ж на основі зерна містять в основному тригліцериди, більшість жирнокислотних залишків яких, як згадувалося вище, представлена насиченими і мононенасиченими (n-9) жирними кислотами. Наприклад, після відгодовування корів травною співвідношення n-6 / n-3 жирних кислот в яловичині складає 2:1, а зерном – 4:1. Тому зараз рекомендують додавати до корму для курей риба'ячий жир чи багату на АЛК лляну олію; у деяких країнах Європи вже продаються яйця з підвищеним вмістом ДГК (Apt, Behrens, 1999; Ward, Singh, 2005).

Найбільш традиційними джерелами довголанцюгових ПНЖК є риба, переважно морська, і риба'ячий жир (причому ЕПК зазвичай домінує в риба-фітофагів, а ДГК – у хижаків) (Басова, 2005). Однак використання риба'ячого жиру потребує вживання певних заходів безпеки. Так, маленьким дітям, вагітним і матерям-годувальницям рекомендується уникати споживання значних кількостей риба'ячого жиру, оскільки в ньому можуть накопичуватися ртуть, діоксини чи інші стійкі гідрофобні токсичні речовини (хоча загалом для інших груп людей його корисність для здоров'я набагато перевищує ризик) (Ward, Singh, 2005). До того ж, застосування риба'ячого жиру в якості харчової добавки є дещо обмеженим через проблеми, пов'язані зі специфічним риба'ячим запахом, неприємним смаком і низькою стійкістю до окиснення. У тригліцеридах риба'ячого жиру досить важко контролювати й регулювати відносний вміст ПНЖК (Patil et al., 2007). Деякі випадки, наприклад, виробництво харчування для недоношених немовлят, взагалі вимагають застосування індивідуальних жирних кислот (single cell oils, SCO). А враховуючи те, що ПНЖК риба'ячого жиру в кінцевому підсумку походять від мікроводоростей (Yongmanitchai, Ward, 1989), ці організми заслуговують на пильну увагу як придатне для широкомасштабного виробництва джерело довголанцюгових жирних кислот.

У табл. 5.6 наведені найбільш комерційно значимі ПНЖК мікроводоростей. Зараз єдиною доступною у вільному продажі ПНЖК, виділеною з водоростей, є ДГК. Певні види мікроводоростей (*Porphyridium purpureum*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis* sp., *Nitzschia laevis*) здатні продукувати ЕПК у промислових масштабах (Apt, Behrens, 1999; Spolaore et al., 2006), проте на теперішній час очищена олія з цих водоростей не може конкурувати з жирами, виділеними з інших джерел. Ця ж проблема існує і для інших ПНЖК – γ -ліноленової та арахідонової кислот.

Таблиця 5.6. Области застосування основних поліненасичених жирних кислот, одержаних з мікроводоростей (Spolaore et al., 2006)

Жирна кислота	Галузь застосування	Продукт
γ-Ліноленова (ГЛК) 18:3n-6	Харчування для доношених немовлят Харчові добавки	<i>Spirulina</i> sp.
Арахідонова (АК) 20:4n-6	Харчування для доношених і недоношених немовлят Харчові добавки	<i>Porphyridium</i> sp.
Ейкозапентаєнова (ЕПК) 20:5n-3	Харчові добавки Аквакультура	<i>Nannochloropsis</i> sp. <i>Isochrysis galbana</i> <i>Phaeodactylum tricornutum</i> <i>Porphyridium purpureum</i> <i>Nitzschia laevis</i> <i>Navicula</i> sp.
Докозагексаєнова (ДГК) 22:6n-3	Харчування для доношених і недоношених немовлят Харчові добавки Аквакультура	<i>Cryptocodinium cohnii</i> <i>Schizochytrium</i> sp. <i>Ulkenia</i> sp.

Позитивний вплив γ-ліноленової кислоти (ГЛК) на здоров'я людини часто недооцінюють у порівнянні з довголанцюговими ПНЖК (ЕПК і ДГК). ГЛК є ефективним засобом при лікуванні таких захворювань як атопічна екзема, ревматоїдний артрит, розсіяний склероз, шизофренія, полегшує прояви передменструального синдрому (Ward, Singh, 2005). Вона може стримувати ріст пухлин і утворення метастазів; *in vitro* була показана її здатність руйнувати уражені ВІЛ Т-лімфоцити. У фітотерапії рекомендується широко застосовувати рослини, які містять ГЛК, для лікування запальних і автоімунних захворювань. Загальновідомим джерелом ГЛК є синьозелена водорість *Spirulina platensis*, хоча великі кількості цієї речовини нагромаджують також *Isochrysis galbana* і *Dunaliella tertiolecta*.

Арахідонова кислота (АК) є найбільш розповсюдженою ПНЖК у тканинах людини, вона присутня в різних органах, м'язовій тканині і крові і в основному входить до складу фосфоліпідів (Ward, Singh, 2005). АК є головною n-6-жирною кислотою мозку і, разом з ДГК, необхідна для розвитку мозку в дітей (Crawford, 2000). Хоча ГЛК є метаболічним попередником АК, її перетворення, каталізоване ферментом Δ6-десатуразою, відбувається дуже повільно, а вміст самого ферменту в людини є невеликим. Тому вважається за краще вживати продукти, що містять безпосередньо арахідонову кислоту, а не γ-ліноленову. Також АК є прямим прекурсором ряду ейкозаноїдів, які регулюють метаболізм ліпопротеїнів,

реологічні властивості крові, функціонування лейкоцитів і агрегацію тромбоцитів (Ward, Singh, 2005).

Певні суперечки викликає доцільність використання ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК) як харчової добавки. Добре відомо, що ЕПК має протизапальну дію. Застосування етилових естерів ЕПК може бути ефективним при лікуванні атеросклерозу та гіперліпемії. Разом з тим, незважаючи на активну підтримку ідеї вживати ПНЖК для запобігання проблемам із серцево-судинною системою (Амосова та ін., 2000), існують побоювання, що в окремих індивідуумів ЕПК може викликати стоншення стінок артерій і, як наслідок, серйозні кровотечі (Ward, Singh, 2005). Однак останнім часом повідомляють про можливість застосовувати ЕПК при лікуванні мозкових розладів, включаючи шизофренію, та в якості допоміжного засобу – у терапії певних видів пухлин (Ward, Singh, 2005). Продуктами метаболізму ЕПК є ейкозаноїди з антитромботичною та антиагрегаційною дією (Apt, Behrens, 1999). ЕПК є широко розповсюдженою в діатомових, еустигматофітових, примнезієвих і червоних водоростей. На жаль, більшість видів мікроводоростей не нагромаджує значні кількості ЕПК у формі тригліцеридів (найбільш придатній для споживання людиною), а здатні до цього організми є облігатними фототрофами, тобто їх комерційне використання має економічні обмеження. На теперішній час у продажу ще немає виділеної з водоростей очищеної олії з високим вмістом ЕПК, хоча висушена біомаса деяких мікроводоростей уже певний час пропонується на ринку як джерело цієї жирної кислоти (Ward, Singh, 2005).

Докозагексаєнову кислоту (ДГК) було виявлено в усіх тканинах людського тіла. Вона є головною структурною жирною кислотою сірої речовини мозку (складає 20-25 % усіх жирних кислот) й сітківки ока ссавців (50-60 % сумарних жирних кислот), обов'язковою складовою серцевого м'яза і сперматозоїдів (Gill, Valivety, 1997; Ward, Singh, 2005). ДГК необхідна для правильного розвитку мозку і очей у плода і новонародженої дитини (Makrides et al., 1995; Jiang et al., 1999; Crawford, 2000), вона покращує концентрацію уваги й гостроту зору, а також, як і ЕПК, справляє беззаперечний позитивний вплив на стан серцево-судинної системи в дорослих (Hogrocks, Yeo, 1999). Існують повідомлення про протизапальну, антитромботичну, антиатеросклеротичну та протипухлинну дію ДГК. Ця речовина пригнічує утворення біоактивних метаболітів – ейкозаноїдів. Нестача n-3-жирних кислот в організмі приводить до падіння рівня ДГК у тканинах, яке супроводжується зниженням здатності до навчання, порушеннями зору і невгамовною спрагою.

ДГК міститься в дуже обмеженій кількості продуктів, в основному в жирній рибі та м'ясі тварин, відгодованих зеленими кормами. Також її було знайдено в грудному молоці, проте в коров'ячому молоці вона відсутня. Серед мікроводоростей штами, багаті на ДГК,

здебільшого належать до динофлагелят або морських гетеротрофних організмів – траустохитридієвих (Apt, Behrens, 1999); менші частки ДГК зустрічаються в деяких примнезієвих, прازیнофітових та криптофітових водоростей.

При дотриманні вегетаріанської дієти запаси ДГК в організмі сильно знижуються, і компенсувати їх не вдається навіть споживанням великих кількостей α -ліноленової кислоти з їжею. Тому для вегетаріанців доповнення раціону продуктами, що містять ДГК, є абсолютно необхідним, і в цьому випадку ПНЖК, одержані з водоростей, є оптимальним рішенням проблеми.

Немовлята, які знаходяться на штучному вигодовуванні, звичайно не одержують ДГК. Починаючи з 1990 року, низка міжнародних організацій (у тому числі ВООЗ) рекомендує включати ДГК до складу дитячого харчування для недоношених і доношених немовлят, щоб зробити його більш подібним до жіночого молока (Apt, Behrens, 1999; Ward, Singh, 2005). Хоча багатим на довголанцюгові n-3 ПНЖК продуктом є риб'ячий жир, зараз він вважається непридатним для годування немовлят. Передусім, присутність у ньому ЕПК, як вважають, може призводити до значної затримки росту та інших вад розвитку (Carlson et al., 1994). До того ж, серйозні побоювання викликає можливість забруднення риб'ячого жиру важкими металами (ртуттю, свинцем, нікелем, арсеном, кадмієм) та іншими токсинами. Тому найбільш розповсюдженим джерелом ДГК, яке зараз використовується в цій галузі, є вирощувана в гетеротрофних умовах морська динофітова водорість *Cryptocodinium cohnii* (Jiang et al., 1999). До 30 % маси сухої речовини цього організму складають жирні кислоти, з яких приблизно половина припадає на ДГК (Henderson et al., 1988; Behrens, Kyle, 1996). В олії, яку одержують з *C. cohnii* (Martek's DHA oil (DHASCO); Martek, Columbia, MD, USA), міститься 40-50 % ДГК у формі триацилгліцеролів (Apt, Behrens, 1999). Іншими домінуючими жирними кислотами є міристинова і пальмітинова, а ЕПК чи інші довголанцюгові поліненасичені жирні кислоти відсутні (Behrens, Kyle, 1996). Виробництво цієї олії в 2003 р. становило 240 т, а дитяче харчування, яке її містить, продавалося більше ніж у 60 країнах світу, серед них – у Великій Британії, Мексиці, Китаї, США, Канаді (Spolaore et al., 2006).

Американська фірма OmegaTech, яка є підрозділом компанії Martek, використовує для виробництва ДГК-вмісної олії одноклітинні подібні до водоростей протисти *Schizochytrium*. У деяких їх штамів на жирні кислоти припадає більше 70 % біомаси, а на ДГК – близько 35 % жирних кислот; таким чином, вихід ДГК в умовах лабораторії може перевищувати 3 г/л за добу (Nakahara et al., 1996; Ratledge, 2004). З *Schizochytrium* одержують дешеву олію, відому раніше як DHA Gold (виробництво в 2003 р. складало 10 т). Ця олія використовується як харчова добавка для дорослих у різноманітних продуктах і напоях (тверді сири, йогурти,

маргарини, соуси, сухі сніданки, тощо), у спеціальних продуктах для здорового харчування (у тому числі для вагітних, годувальниць і для тих, хто страждає на серцево-судинні хвороби) та кормах для тварин (Ward, Singh, 2005; Spolaore et al., 2006). Також Nutrinova process (Франкфурт, Німеччина) використовує *Ulkenia* sp. для виробництва олії під комерційною назвою DHActive (Spolaore et al., 2006). Спроби одержувати ДГК за допомогою фотоавтотрофного культивування мікроводоростей у фотобіореакторі виявилися невдалими через обмежену освітленість і акумуляцію кисню (Grima et al., 1993; Chen, 1996).

У недавніх дослідженнях було показано, що одержана з водоростей ДГК сильніше пригнічує ріст пухлин, ніж риб'ячий жир (Kato et al., 2002).

Завдяки збалансованому вмісту поживних речовин, у тому числі ПНЖК, мікроводорості зараз вважають найбільш оптимальним кормом для личинок зоопланктону, ракоподібних, риб і моллюсків (Басова, 2005; Patil et al., 2007). Висушена біомаса водоростей декількох видів (*Nannochloropsis*, *Isochrysis*, *Tetraselmis*, *Nitzschia*, *Navicula*, *Phaeodactylum*, *Porphyridium*) продається як джерело поліненасичених жирних кислот (передусім ЕПК) для застосування в аквакультурі (Apt, Behrens, 1999). У цій галузі особливого значення набуває розмір часток агрегатів мікроводоростей – він не повинен перевищувати 50-150 мкм для ефективного споживання корму дрібними водними організмами (Ward, Singh, 2005). Щоб досягти такого ступеня дисперсності мікроводоростей, їх висушують при розбризкуванні або ж віддають перевагу тим видам водоростей, які утворюють агрегати у вигляді ниток, а не схильних до злипання кульок. З метою підвищення виходу ПНЖК з біомаси успішно застосовуються полікультури водоростей (Басова, 2005; Spolaore et al., 2006).

Для безпосереднього споживання людиною мікроводоростей треба, щоб ПНЖК входили до складу природних для неї сполук – тригліцеридів чи фосфоліпідів. Це може становити деякі перешкоди використанню водоростей, особливо в галузі виробництва заміників жіночого молока, адже більшість видів не нагромаджує триацилгліцероли у великих кількостях, а здатні до цього організми найчастіше є облігатними фототрофами (Ward, Singh, 2005). Так, арахідонова кислота в *Porphyridium cruentum* і n-3 кислоти в *Phaeodactylum tricornutum* зв'язуються переважно з галактоліпідами; у відомого продуцента γ-ліноленової кислоти *Spirulina platensis* вміст цієї кислоти в тригліцеридах не перевищує 1,5 %. Однак у гетеротрофних водоростей (види *Pythium*, *Cryptocodinium* і *Nitzschia*) ПНЖК входять переважно до складу тригліцеридів і фосфоліпідів. Наприклад, у *Cryptocodinium cohnii*, з якого одержують збагачену докозагексаєновою кислотою олію DHASCO, 90 % усіх ліпідів складають триацилгліцероли (Ward, Singh, 2005).

Поліненасичені жирні кислоти мають низьку стійкість до окиснення через великий вміст подвійних зв'язків. При безпосередньому споживанні в їжу олій, що містять ПНЖК,

ефективним шляхом подолання цієї проблеми є використання желатинових капсул. Якщо ж виникає потреба додавати багату на ПНЖК олію до сухих харчових продуктів, у промисловості застосовують метод мікроінкапсуляції (Ward, Singh, 2005). У цілих клітинах мікроводоростей стабільність ліпідів має бути вищою, ніж в інших джерелах ПНЖК, оскільки мікроводоростям притаманний високий вміст антиоксидантів – каротиноїдів і вітамінів, до того ж клітинна стінка водоростей виконує роль природної капсули (Patil et al., 2007).

Легко спрогнозувати розширення й урізноманітнення ринку продуктів, що містять ПНЖК. Шляхом зваженого добору видів і штамів водоростей та регулювання фізичних і хімічних параметрів середовища культивування можна створювати системи, які продукують специфічні жирні кислоти та ліпіди в комерційних масштабах. До того ж, удосконалення виробництва ПНЖК може відбуватися за рахунок успіхів у клітинній і молекулярній біології та рекомбінантних технологіях. Подальші дослідження мають бути сфокусовані на покращенні продукційних систем і генетичній модифікації об'єктів; у такому разі продукти з мікроводоростей можуть стати ще більш різноманітними та економічно конкурентоспроможними.

5.4. Мікроводорість *Botryococcus braunii* Kütz. – продуцент вуглеводнів.

Походження нафти

Протягом останніх десятиріч велика увага дослідників прикута до вивчення зеленої колоніальної водорості *Botryococcus braunii* порядку Chlorococcales (клас Chlorophyceae), яка завдяки своїм біологічним властивостям вважається дуже перспективним потенційним продуцентом екологічно чистого і поновлюваного джерела енергії – рідких вуглеводнів. *B. braunii* широко розповсюджена в прісних і солонуватих водах помірних і тропічних зон і містить до 75 % вуглеводнів від маси сухої речовини в залежності від умов росту і різновидів водорості. Вуглеводні накопичуються всередині клітин, і водорості з великим їх вмістом спливають на поверхню водойм. Після збирання водоростей ці вуглеводні легко відділити шляхом екстракції будь-яким органічним розчинником або методом деструктивного відгону. Таким шляхом може бути отримана речовина, яка є близькою за своїм складом до дизельного палива і гасу. Вихід вуглеводнів за оптимальних умов культивування може досягати 60 т/га за рік.

Мікроскопічний аналіз демонструє типову морфологію колонії *B. braunii* (рис. 5.5, А), що характеризується ботриїдною організацією клітин, з'єднаних до купи

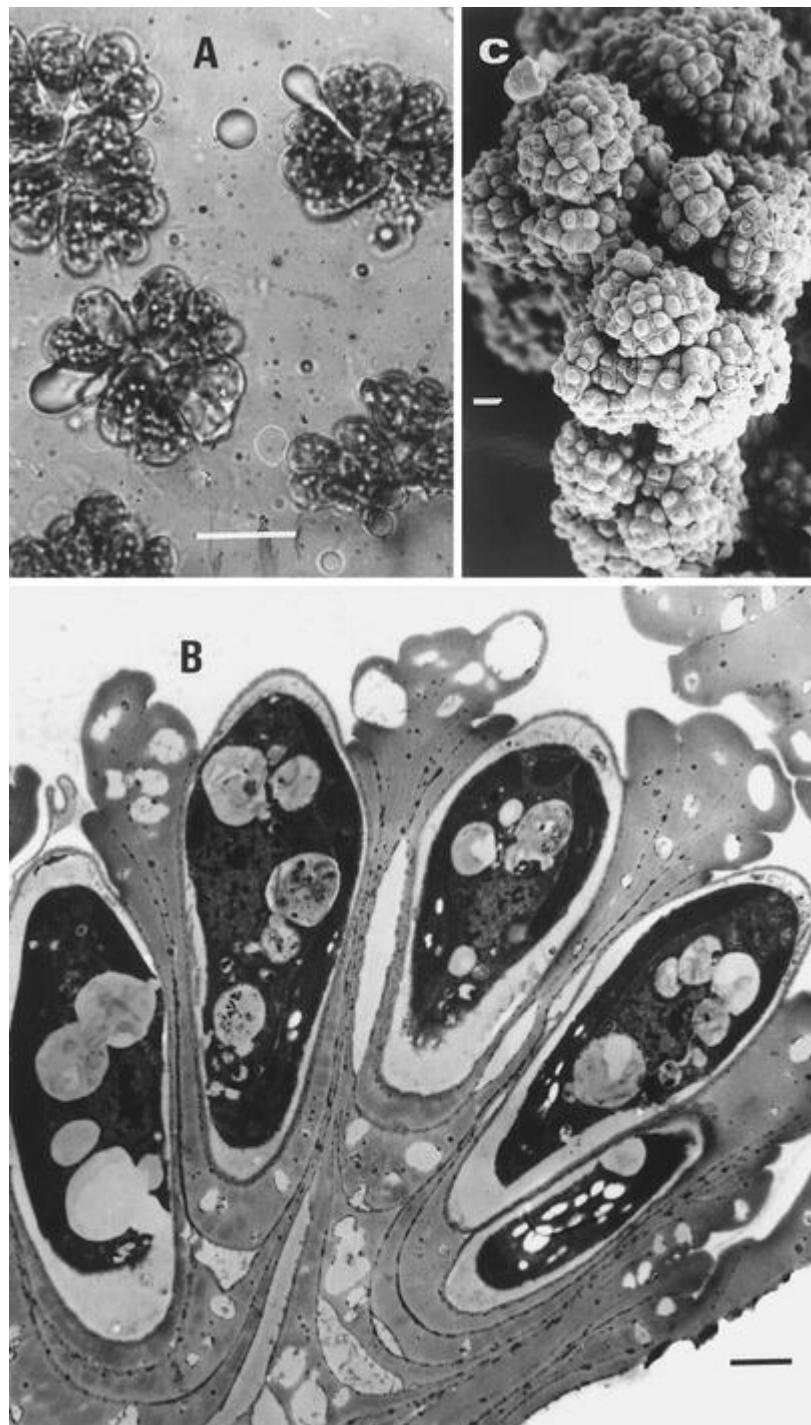


Рис. 5.5. Мікрофотографії клітин *B. braunii*: А – клітини раси А під світловим мікроскопом; В – трансмісійна електронна мікроскопія колонії клітин раси L; С – скануюча електронна мікроскопія великої колонії клітин раси В. Масштаб А, С – 10 мкм; В – 1 мкм (за Metzger, Largeau, 2005).

променезаломлюючим матриксом, який містить ліпіди. При накладанні покривного скла з деяких клітин витискаються олійні крапельки. Ультраструктурні дослідження показали, що матрикс, який оточує базальну частину клітин, складається з зовнішніх стінок і утворюється

в ході послідовних клітинних поділів (рис. 5.5, В). У зовнішніх стінках *B. braunii* накопичуються внутрішньоклітинні вуглеводні. Існує значна морфологічна гетерогенність між зразками водоростей, зібраних у природних озерах, і тими, що культивуються в лабораторії. Найбільш помітні варіації спостерігаються в розмірах і формі клітин, які можуть бути більш-менш зануреними в матрикс, а також у наявності (або відсутності) заломлюючих ниток, які з'єднують клітини в дуже великі колонії (рис. 5.5, С). На підставі морфологічного різноманіття без урахування хімічного складу клітин Комарек і Марван (Komárek, Marvan, 1992) виявили щонайменше 13 видів *Botryococcus*. Пізніше було показано, що в кожній хімічній расі і для кожного виду морфологічні ознаки можуть варіювати залежно від віку і умов існування. Завдяки аналізу нуклеотидної послідовності 18S рРНК чотирьох видів *B. braunii* трьох хімічних рас було встановлено, що ці види утворюють монофілетичну групу (Senousy et al., 2004). До теперішнього часу залишається відкритим питання, чи належать численні різновиди *B. braunii* до єдиного виду, до трьох видів згідно з природою синтезованих вуглеводнів або до декількох підвидів (Metzger, Largeau, 2005).

Особливу увагу дослідників привертає ліпідний метаболізм *B. braunii* і склад жирних кислот, з яких синтезуються вуглеводні. Згідно з класичним визначенням, ліпіди – це сполуки, які синтезуються в живих організмах і слабо розчиняються у воді, але добре – в органічних розчинниках. В їх структурі містяться лінійні вуглеводневі ланцюги або залишки ізопрену і різні функціональні групи, особливо ті, що містять кисень.

В експоненційній фазі росту сумарний вміст ліпідів у біомасі водорості є мінімальним (близько 7 % ваги сухої біомаси), він зростає в процесі розвитку культури і при переході в стаціонарну фазу досягає 25-30 %. Внутрішньо- і зовнішньоклітинні ліпіди водорості *B. braunii* представлені різними класами і включають полярні ліпіди, діацилгліцероли, стероли, вільні жирні кислоти, триацилгліцероли, метилові естери жирних кислот, естери стеролів, вуглеводні, а також неідентифіковані фракції. Для внутрішньоклітинних ліпідів характерне домінування в період активного росту полярних ліпідів (до 50 % від загальної кількості ліпідів) і зниження їх вмісту в стаціонарній фазі (до 25-30 %). Вміст вільних жирних кислот і спиртів мало залежить від фази росту культури і складає по 8-10 %. До мінорних компонентів (1-3 %) можна віднести дигліцериди, стероли й естери стеролів.

Ретельне вивчення хімічного складу зразків *B. braunii*, які були зібрані в різних географічних зонах, дозволило встановити, що водорості в природі присутні в декількох різновидах і відрізняються пігментацією і структурою синтезованих вуглеводнів. За цією ознакою водорості поділяють на три хімічні раси.

- раса А продукує, головним чином, *n*-алкадієни і триєни з непарним числом атомів вуглецю від C₂₃ до C₃₃;

- раса В – C_{30} - C_{37} поліненасичені тритерпени (так звані “ботриоккокцени”) і C_{31} - C_{34} метильовані сквалени;
- раса L продукує єдиний нециклічний диненасичений тетратерпеноїд – лікопадієн.

Хімічна будова деяких вуглеводнів, які характерні для трьох хімічних рас *B. braunii*, наведена на рис. 5.6.

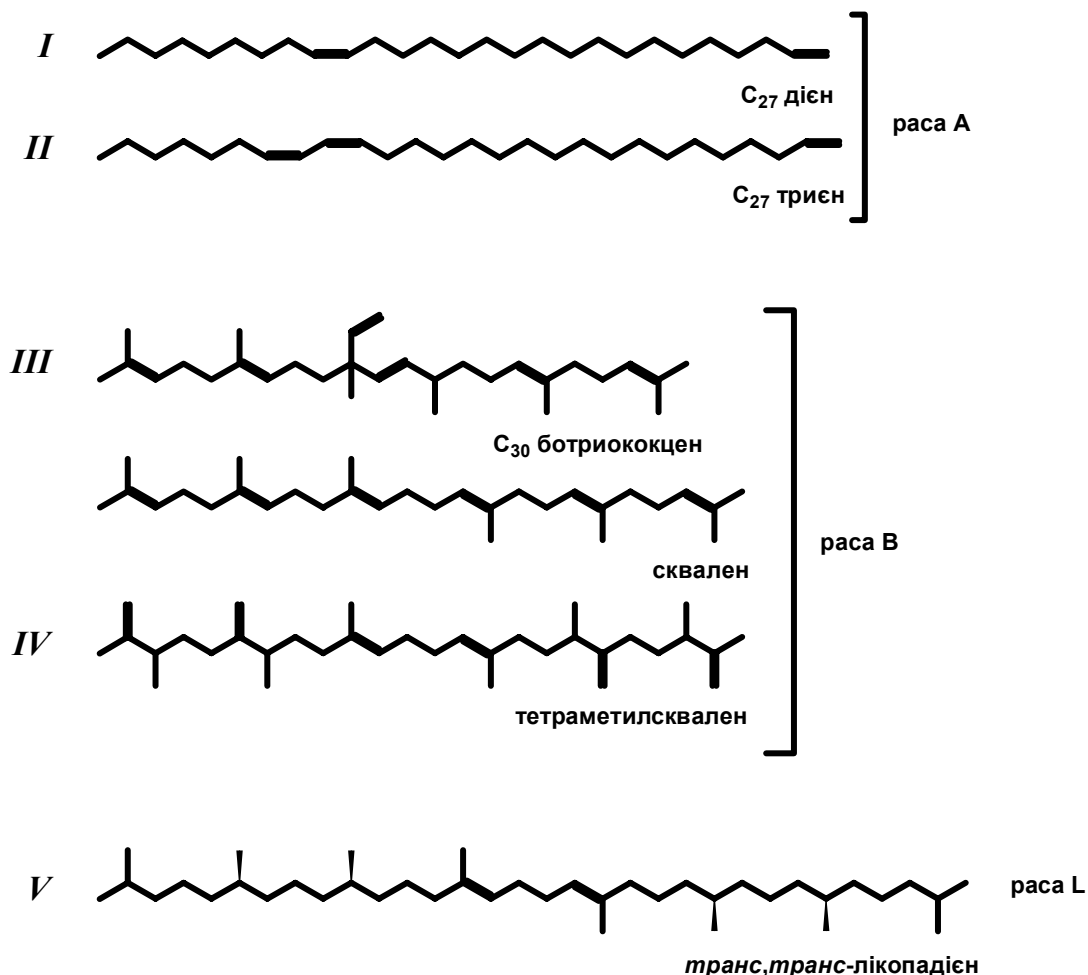


Рис. 5.6. Типові вуглеводні, які продукуються трьома хімічними расами *B. braunii*.

Крім вуглеводнів і класичних ліпідів, клітини *B. braunii* також синтезують етерифіковані ліпіди особливого типу, які не є похідними гліцерину на відміну від більшості ліпідів інших живих організмів. У кожній расі етерифіковані ліпіди тісно пов'язані з вуглеводнями; а деякі види продукують їх у переважній кількості. Крім того, з ліпідних екстрактів *B. braunii* були ізольовані неполісахаридні біополімери – поліальдегіди і поліацетали з дуже великою молекулярною масою (від 10 кДа до 4000 кДа). Вони, можливо, є попередниками нерозчинних полімерних матеріалів, з яких збудовано зовнішні стінки цих водоростей.

Фракція рідких вуглеводнів складає до 12-14 % на початковій фазі росту культури. Склад зовнішньоклітинних ліпідів *B. braunii* трохи відрізняється. Вміст полярних ліпідів, стеролів, вільних жирних кислот і тригліцеридів мало залежить від фази росту культури і є практично однаковим – 14-20 % від сумарного вмісту ліпідів. Рідкі вуглеводні виявлені в складі екстрацелюлярних продуктів обміну на всіх фазах росту водорості; максимальний їх вміст (вище 30 %) відмічається в експоненційній фазі.

Серед жирних кислот ліпідів *B. braunii* домінують пальмітинова й олеїнова кислоти (до 40-48 % від сумарного вмісту жирних кислот). Ці жирні кислоти є попередниками синтезу рідких вуглеводнів у *B. braunii* (Chan Yong et al., 1986). Коефіцієнт насиченості ліпідів у період активного росту водорості становить 0,7 і падає до 0,4 у стаціонарній фазі; паралельно відбувається зниження в 2 рази відношення дієнових кислот до триєнових на фоні зростання відносного вмісту моноєнових кислот. Насиченість полярних ліпідів, навпаки, зростає при старінні культури, яке супроводжується підвищенням частки моноєнових і дієнових жирних кислот. Склад жирних кислот триацилгліцеролів у ході розвитку водорості змінюється незначно.

5.4.1. Вміст вуглеводнів у *Botryococcus braunii*

У літературі є відомості про вміст вуглеводнів у близько 60 зразків *B. braunii* як у видів, культивованих у лабораторіях, так і зібраних у всіх кліматичних зонах, за винятком Антарктики (Komárek, Marvan, 1992; Волова и др., 2001; Metzger, Largeau, 2005). Водорості рас А і В були ідентифіковані в альпійських, континентальних, помірних і тропічних озерах, а водорості раси L спостерігалися тільки у водних зразках, зібраних у тропіках. Вміст вуглеводнів у зразків раси А є дуже мінливим і складає від 0,4 % (озеро Овержую, Болівія) до 61,0 % від маси сухої речовини (озеро Шамекон, Франція) (табл. 5.7). У водоростях раси В вміст вуглеводнів звичайно складає 30-40 % сухої маси (Okada et al., 1995), хоча в деяких зразків вміст вуглеводнів є нижчим. Вважається, що виключно високий рівень боттриококценів (до 86 %), про який повідомлялося в ранніх роботах (Brown et al., 1969), пов'язаний, ймовірно, з частковим лізисом або деградацією клітин. У водоростей раси L вміст вуглеводнів коливається від менш ніж 0,1 до 8,0 %. У табл. 5.7 порівнюються дані про вміст вуглеводнів і деяких інших ліпідів для трьох видів раси А і по одному виду рас В і L. Залежно від виду вміст вуглеводнів та етерифікованих ліпідів значно змінюється. Дослідження за допомогою методів ВЕРХ, ^1H і ^{13}C ЯМР дозволили ізолювати та ідентифікувати нові класи ліпідів, зокрема боттриали (альдегіди C_{52} - C_{64} , утворені внаслідок

альдольної конденсації), алкеніловані феноли з дуже довгими ланцюгами, епоксидні похідні вуглеводнів та етерифіковані ліпіди високої молекулярної маси (Волова и др., 1998).

Таблиця 5.7. Відносний вміст деяких видів ліпідів у п'яти різновидах трьох хімічних рас *B. braunii* різного походження (% від маси сухої речовини) (Metzger, Largeau, 2005)

	Місце знаходження				
	Болівія	Велика Британія	Марокко	Мартиніка	Берег Слонової Кості
Вуглеводні	0,4	9	20	32	3
Етерифіковані ліпіди	35	5	н/в*	0,2	13
Епоксиди	н/в	4	н/в	1	0,6
Триацилгліцероли	2	6	н/в	н/в	н/в

* – не виявлено

5.4.2. Різноманіття вуглеводнів *Botryococcus braunii*

Різновиди вуглеводнів *B. braunii* раси А

У зразках культивованих і диких видів *B. braunii* раси А виявлено близько 50 різних вуглеводнів, які належать до 30 хімічних структур. Ці сполуки мають від одного до чотирьох подвійних зв'язків, а вуглецевий ланцюг майже завжди складається з непарної кількості вуглецевих атомів. Наявність у складі даного різновиду *B. braunii* того або іншого вуглеводню знаходиться під контролем генетичних чинників: варіації спостерігалися в різних штамів, які культивували в ідентичних умовах. Загалом, переважають дієнові вуглеводні, переважно в *цис*-конфігурації. Слід відмітити, що насичені парафінові вуглеводні взагалі не синтезуються в живих клітинах.

У триєнових вуглеводнів найчастіше зустрічаються два кон'югованих зв'язки посередині ланцюга, значно рідше зустрічаються молекули, в яких два кон'югованих зв'язки знаходяться в термінальній позиції (Chan Yong et al., 1986). Лише один тип тетраєнів з трьома кон'югованими зв'язками в термінальній позиції був ідентифікований у *B. braunii* раси А. Інкубація з радіоактивними мітками дозволила встановити, що прямим попередником дієнів і триєнів є олеїнова кислота і що фінальним етапом формування термінальних подвійних зв'язків є декарбоксилування похідних дуже довгих полікарбонових жирних кислот.

Вуглеводні *B. braunii* раси В

Ботриококцени, специфічні вуглеводні *B. braunii* раси В, належать до класу тритерпеноїдів, що охоплює ациклічні і циклічні сполуки. Ідентифіковано понад 50 ботриококценів, але через труднощі з їх очищенням визначено тільки близько 15 структур.

Першою була описана одна зі сполук C_{34} , ізольована з дикого виду в 1973 р. А на сьогодні відомі п'ять інших ізомерів C_{34} .

Ботриококцен C_{30} (рис. 5.6), ізольований з культивованого штаму, є попередником усіх гомологічних сполук (Wolf et al., 1985), і наявність конкретного ботриококцену залежить від виду. Крім того, водорості раси В синтезують сквалени C_{31} - C_{34} і метильовані сквалени (Metzger et al., 1990). Вони звичайно присутні в слідових кількостях, однак в одного виду, який був зібраний у Болівії – у значній кількості (до 4,5 % сухої біомаси).

Вуглеводні *B. braunii* раси L

Дванадцять типів етерифікованих ліпідів, лікопанеролів було ізольовано з клітин *B. braunii* раси L, і вони в цілому складали майже 10 % сухої біомаси. Серед великої різноманітності цих сполук зустрічаються терпеноїди, алкіловані феноли, резорцин і/або нетерпеноїдні елементи, пов'язані один з одним етерними і/або феноксильними зв'язками. Кожна сполука містить від одного до трьох терпеноїдних залишків, які, як правило, мають тетрагідрофуранове або тетрагідропіранове кільце, ймовірно похідне від дієпоксилікопіну.

На рис. 5.7 наведена, як приклад, одна зі структур етерифікованого ліпиду ($C_{80}H_{158}O_5$), ідентифікована в клітинах *B. braunii* раси L у 2000 р. Пізніше були ідентифіковані структури декількох серій етерів з довжиною вуглецевого ланцюга C_{160} . На підставі інкубації мікроводоростей з радіоактивно міченими попередниками було встановлено, що ці етери є результатом конденсації епоксидів.

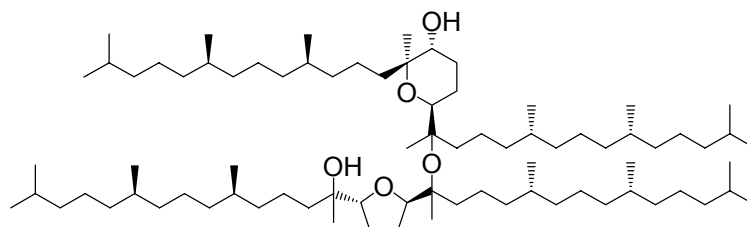


Рис. 5.7. Структура етерифікованого ліпиду *B. braunii* раси L.

Єдиним вуглеводнем, який був виявлений у видах, зібраних у Таїланді і Кот'д'Івуар, був *транс,транс*-лікопадієн (рис. 5.6). Ще один ізомер невідомої структури був виявлений у двох видах, зібраних в Індії. Про біосинтез лікопадієну відомостей у літературі немає.

Полімерні ліпіди дуже високої молекулярної маси (M_n від 10 до 10 тис кДа) екстрагуються за допомогою органічних розчинників з усіх видів *B. braunii*. Вони походять від α -розгалужених, α -ненасичених альдегідів, подібних до ботриалів, і утворюються внаслідок поліконденсації C_{32} α,ω -діальдегідів. Нещодавно були ізольовані унікальні

скваленові похідні цього класу полімерів, зокрема моноциклічні сполуки, що представлені на рис. 5.8.

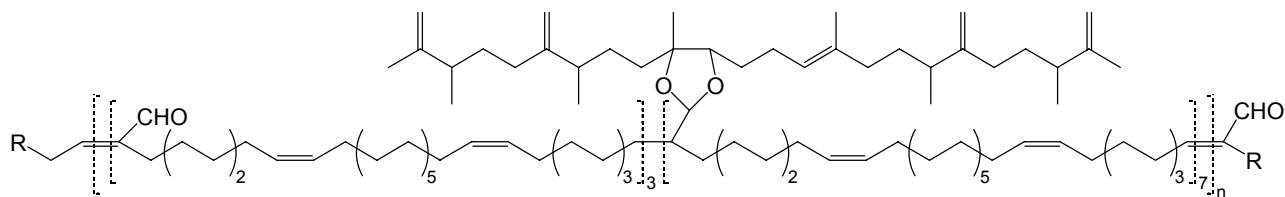


Рис. 5.8. Структура скваленових похідних ліпідів *Botryococcus braunii*.

5.4.3. Вивчення біотехнологічних перспектив культивування *Botryococcus braunii*

Більшість біотехнологічних робіт стосуються *B. braunii* раси А, і значно менше досліджень присвячено расі В. Відповідно, висновки не можуть стосуватися всіх різновидів *B. braunii*.

Показано, що продуктивність вуглеводнів трьох хімічних рас *B. braunii* є оптимальною протягом експоненційної фази росту. Тому продукування вуглеводнів, здається, є природною особливістю *B. braunii* і не пов'язане зі стресом або старінням. Синтез вуглеводнів не відбувається в середовищах, які є дефіцитними за азотом або фосфором. Так само показано, що продукування етерифікованих ліпідів є максимальним протягом експоненційної і ранніх стадій уповільнення зростання.

Подібно до всіх фотосинтезуючих мікроорганізмів, *B. braunii* вимагає для зростання CO_2 , світла, неорганічних поживних речовин і води. Сприятливим для росту мікроросток усіх трьох рас є модифіковане середовище ЧУ 13 (Brown et al., 1969; Largeau et al., 1980), з використанням якого було показано, що концентрація фосфату не є обмежуючим чинником для зростання. Навпаки, збільшення вмісту нітратів призводить до пролонгації експоненційної фази, але зрештою це викликає зменшення продукування вуглеводнів на фоні зростання виробництва біомаси. Для *B. braunii* раси В було знайдено, що аміак перешкоджає біосинтезу ботриококцену, у той час як синтез деяких амінокислот у присутності аміаку зростає. При вирощуванні культур *B. braunii* раси А нітрат може бути з успіхом замінений на нітрит (Yang et al., 2004a).

Надзвичайно стимулює зростання культури *B. braunii* повітря з підвищеним вмістом CO_2 . У присутності 1 % CO_2 час подвоєння біомаси в експоненційній фазі скорочується до 2 днів порівняно з 7 днями, якщо культура зростає на повітрі, а продукування вуглеводнів

збільшується в 5 разів. Додавання гідрокарбонату до середовища, навпаки, не впливає на швидкість росту.

Вирощування *B. braunii* здійснюється в широкому діапазоні інтенсивності світла (15-180 Вт м⁻²), але синтезу вуглеводнів сприяє помірне освітлення (40-90 Вт м⁻²) (Serák, Lukavsky, 1994). В умовах аерліфтного культивування оптимізація освітлення призводить до дворазового збільшення продуктивності як біомаси, так і утворення вуглеводнів (Brenckmann et al., 1985).

Імобілізація колоній *B. braunii* в гранулах альгілату кальцію дозволила виявити деякі цікаві переваги такого культивування порівняно з суспензійною культурою: посилення фотосинтетичної активності, стійкість проти фотоінгібування в умовах високого освітлення і збільшення продукування вуглеводнів, незважаючи на зменшення загального приросту біомаси. На жаль, гранули альгілату кальцію нестабільні й не можуть бути використані при масштабному культивуванні протягом тривалих періодів (Baillez et al., 1985). Спроба іммобілізувати клітини *B. braunii* в дуже стійку поліуретанову піну з'явилася невдалою через пошкодження культури, ймовірно, через отруйні ефекти полімеру.

У природі представники *B. braunii*, так само як багато інших видів, здатні до бурхливого росту – явища, відомого як “цвітіння водойм”, але їх, на відміну від мікроводоростей, які інтенсивно ростуть, не вдається культивувати у відкритих водоймах у неконтрольованих умовах. Більшість досліджень із впливу різних чинників на виробництво біомаси і вуглеводнів *B. braunii* здійснювалися в циліндричних лабораторних аерліфтних системах. Водорість *B. braunii* також культивували в лабораторному масштабі в трубчастих біореакторах під природним світлом при занурюванні культиваційних трубок у воду для охолодження. Для такого культивування були побудовані апарати об'ємом до 200 л, але ефективність у більшому масштабі не була перевірена.

Використання попередньо оброблених стічних вод зі свинарників і домогосподарств для культивування *B. braunii* показало, що клітини мікроводорості поглинають із цих середовищ нітрати і фосфати (Sawayama et al., 1999; An et al., 2003). Крім того, концентрації таких токсичних металів, як арсен, хром і кадмій у воді значно знижувалися в процесі росту культури (Sawayama et al., 1994). При вирощуванні *B. braunii* в періодичній культурі з використанням вторинних оброблених стічних вод свинарника біомаса, яка накопичувалася, складала 8,5 г сухих клітин мікроводоростей і 0,95 г вуглеводнів на 1 л культурального середовища (An et al., 2003).

Можливість використання промислових газів як джерела CO₂ для культивування *B. braunii* витікає зі стійкості культури до деяких забруднюючих агентів. Дійсно, сульфід і гідросульфід (у низькій концентрації) могли використовуватися клітинами *B. braunii* як

джерела сірки, ймовірно, через їх повітряне окиснення в сульфати (Yang et al., 2004b). Оксиди азоту також можуть застосовуватися як єдине джерело азоту завдяки їхньому перетворенню на нітрати у воді.

Класичними способами збирання і концентрування біомаси мікроводоростей, які нерівномірно сконцентровані в культуральному середовищі, є фільтрація або центрифугування. Клітини *B. braunii* раси А при зростанні рН середовища до 11 злипаються в агрегати. Вуглеводні з клітин отримують шляхом екстракції сухої біомаси органічними розчинниками. З цією метою також використовують суперкритичну екстракцію за допомогою рідкого CO₂. Було знайдено, що оптимальним тиском при CO₂-екстракції є 30 МПа.

Унаслідок локалізації великої частини вуглеводнів у зовнішніх стінках мікроводорості вони можуть бути ефективно вилучені при нетривалому контакті сирової біомаси з неотруйним розчинником. Таким шляхом можуть бути екстраговані гексаном до 70 % загальної кількості вуглеводнів без порушення життєздатності клітин мікроводорості.

Рідке паливо з *B. braunii* може бути отримано також шляхом термохімічного зрідження біомаси в присутності карбонату натрію (Sawayama et al., 1999).

Шляхи біосинтезу ботриококценів і метильованих скваленів привертають до себе велику увагу в зв'язку з тим, що ці вуглеводні – специфічні маркери *B. braunii* – були знайдені в нафтових родовищах і нафтових сланцях, іноді в значній кількості. Ботриококцени, як і метильовані сквалени, синтезуються в клітині за немевалонатним терпеноїдним шляхом, вірогідно через близький попередник – псевдосквалендифосфат. Послідовні метилування C₃₀ ботриококцену і сквалену приводять до синтезу відповідних високомолекулярних гомологів. Хоча вплив різних параметрів культивування на виробництво вуглеводнів клітинами деяких різновидів *B. braunii* зараз досить добре вивчений, ще не знайдено культури, яку можна було б використовувати в біотехнологічному виробництві поновлюваних вуглеводнів. Проте вдалося ввести ген скваленсинтази в клітини *Escherichia coli*, і клонування цих генетично модифікованих організмів відкриває широкі перспективи для виробництва вуглеводнів мікроорганізмами, які швидко ростуть (Okada et al., 2004).

5.4.4. Можлива роль *Botryococcus braunii* в утворенні нафти

Нафта – дуже складна гідрофобна суміш, яка утворилася протягом мільйонів років унаслідок перетворення органічних сполук у водно-осадових відкладеннях. Найважливішою складовою нафти є ізопреноїдні вуглеводні C₁₀-C₄₀, які представлені аліфатичними,

аліциклічними й ароматичними сполуками. Біогенне походження нафти не викликає сумніву, але біохімічні шляхи і механізми, за рахунок яких біоорганічні попередники нафти перетворювалися на ізопреноїдні петровуглеводні, залишаються нез'ясованими.

Використання ізопреноїдних вуглеводнів як біомаркерів дозволяє визначити шляхи генезису й хімічної еволюції нафтових родовищ, а також допомагає в розвідці покладів. Існує декілька документованих прикладів наявності специфічних вуглеводнів у нафті неморського походження, які здебільшого відносяться до наземних рослин. Специфічні маркери *B. braunii* – ботриококцени і метильовані сквалени – у значних кількостях були знайдені в складі нафти деяких родовищ (Moldowan, Seifert, 1980; McKirdy et al., 1986). Одним з таких біологічних маркерів є ботриококцен $C_{34}H_{70}$ – характерний вуглеводень зеленої прісноводної водорості *Botryococcus braunii*, вперше знайдений у нафті декількох родовищ острова Суматра та ідентифікований у серії бітумів з 10 різних прибережних місцевостей між Кінгстоном (Північна Австралія) і Портлендом (Вікторія). Біологічні маркери і вуглецево-ізотопний аналіз цих бітумів дозволили встановити новий клас австралійської неморської нафти. Ці бітуми є восковими залишками парафінової або парафін-нафтенкової нафти, яка й походить з підводних покладів і характеризується дуже високим вмістом ботриококценів. На відміну від інших різновидів воскової австралійської нафти, прибережні бітуми містять до 2,6 % сірки і, очевидно, мають водоростеве походження. Їхні геохімічні властивості можуть бути використані для виявлення великих покладів, які знаходяться в товщі озерної води вздовж південної континентальної межі Австралії.

В екстрактах нафти родовища острова Манігіум (Філіппіни), у нафті родовища Дарі (Суматра, Індонезія) і в нафтових сланцях родовища Маомінг у Китаї був ідентифікований вуглеводень 3,7,18,22-тетраметилсквален. У ряді покладів був знайдений споріднений вуглеводень з імовірною структурою 3,7,11,14-тетраметилсквалену. Подібно до C_{34} ботриококцену, ці тетраметилсквалени зазвичай збагачені ^{13}C порівняно з іншими вуглеводнями нафти, такими як *n*-алкани і C_{16-20} ациклічні ізопреноїди. Визначення поліметилскваленів є ще одним засобом ідентифікації зелених водоростей типу *Botryococcus braunii* і їх викопних аналогів у нафті, що допомагає виявленню її походження.

Роль фітопланктонних водоростей у нафтоутворенні потребує подальшого вивчення, так само як і дослідження, пов'язані з виділенням і можливістю утилізації вуглеводнів *B. braunii*, які можуть також сприяти кращому розумінню питання походження нафти.

5.5. Біодизель як альтернативне паливо

Біодизель – альтернативне паливо, яке може бути виготовлене шляхом простого хімічного процесу із сировини біологічного походження (наприклад, з неочищеної рослинної олії) і яке в немодифікованому вигляді може бути використане в будь-якому дизельному двигуні безпосередньо або в суміші з нафтовим дизельним паливом (Schmidt, 2007). Найчастіше терміном “біодизель” позначають алкілові естери жирних кислот, які утворюються при переестерифікації ліпідів рослинних олій або тваринних жирів.

Біодизельне паливо незначно поступається за теплотворною здатністю петродизельному паливу, але значно переважає його за мастильними властивостями, завдяки чому застосування біодизелю подовжує термін експлуатації двигунів. Біодизель є екологічно чистим паливом, і при його використанні рівень шкідливих викидів значно скорочується, зокрема, викиди вуглекислого газу (CO_2) в атмосферу знижуються на 60 % порівняно з петродизельними двигунами (Hill et al., 2006). При потраплянні біодизелю у воду або ґрунт, він зазнає швидкої біодеградації (Schmidt, 2007).

У промислових масштабах біодизельне паливо почали виробляти з 1989 р., і обсяги виробництва стрімко зростають. У табл. 5.8 наведені дані щодо росту виробництва біодизелю в деяких країнах Євросоюзу і США з 2004 по 2006 рр. Європейська рада по біодизелю повідомила, що в 2004 р. ріст виробництва біодизелю в ЄС склав 35 % порівняно з показниками 2003 р. Близько 80 % європейського біодизелю виробляється з ріпакової олії, при цьому приблизно третина врожаю ріпаку в 2004 р. була використана саме для виробництва біопалива.

Усього в Євросоюзі в 2004 р. було нараховано 40 заводів. У США на жовтень 2004 р. діючі потужності складали приблизно 567 тис декалітрів на рік. Наприкінці 2006 р. у США працювали 88 заводів із сумарною потужністю приблизно 2,646 млн декалітрів на рік, і будувався ще 41 завод із сумарною потужністю приблизно 3,965 млн декалітрів на рік. У Канаді наприкінці 2006 р. працювали 4 заводи із сумарною потужністю приблизно 196,5 тис декалітрів на рік.

Вихідною сировиною для виробництва біопалива можуть бути рослинні олії різного походження (табл. 5.9). Найбільш дешевою рослинною сировиною є пальмова олія через високу врожайність олійних пальм. Останнім часом дуже велику увагу привертають мікрородорості як потенційна сировина для виробництва біодизелю.

Таблиця 5.8. Ріст виробництва біодизелю в США і ЄС (тис т)

Країна	2004 р.	2005 р.	2006 р.
	Тис т		
Австрія	57	85	134
Бельгія	-	1	85
Чехія	60	133	203
Франція	348	492	775
Німеччина	1035	1669	2681
Угорщина	-	-	12
Італія	320	396	857
Велика Британія	9	51	445
Латвія	-	5	8
Литва	5	7	10
Польща	-	100	150
Португалія	-	1	146
Словаччина	15	78	89
Словенія	-	8	17
Іспанія	13	73	224
Швеція	1,4	1	52
	2004 р.	2005 р.	2006 р.
Усього в країнах Євросоюзу, млн л	1933,4	3184	6069
США, млн л	94,5	283,5	2200

Урожайність мікроводоростей у багато разів перевищує продуктивність навіть найвроджайніших рослин, а вміст ліпідів на одиницю сухої біомаси є досить високим (табл. 5.9). Тому мікроводорості розглядаються зараз як найбільш перспективна вихідна сировина для виробництва біодизельного палива.

В Європі біодизель виробляється переважно з ріпакової олії; у США – із сої; у Канаді – з каноли (різновид ріпаку); в Індонезії і на Філіппінах – з плодів олійної пальми, а в Бразилії – з рицинової олії. Для виробництва біодизелю також застосовують відпрацьовану рослинну олію, риб'ячий жир і т. ін.

Таблиця 5.9. Продуктивність олійних культур у перерахунку на кількість одержаної олії з 1 га землі (за даними Petroleum Club – <http://www.globalpetroleumclub.com>)

Сировина	кг олії / га	л олії / га
<i>Zea mays</i> (кукурудза)	145	172
<i>Anacardium occidentale</i> (горіх кеш'ю)	148	176
<i>Gossypium</i> sp. (бавовник)	273	325
<i>Cannabis sativa</i> (коноплі)	305	363
<i>Glycine max</i> (соя)	375	446
<i>Linum usitatissimum</i> (льон)	402	478
<i>Cucurbita pepo</i> (насіння гарбуза)	449	534
<i>Coriandrum sativum</i> (коріандр)	450	536
<i>Brassica nigra</i> (насіння гірчиці)	481	572
<i>Sesamum indicum</i> (кунжут)	585	696
<i>Helianthus annuus</i> (соняшник)	800	952
<i>Theobroma cacao</i> (какао)	863	1026
<i>Arachis hypogaea</i> (арахіс)	890	1059
<i>Papaver rhoeas</i> (мак)	978	1163
<i>Brassica napus</i> (ріпак)	1000	1190
<i>Olea europaea</i> (олива)	1019	1212
<i>Ricinus communis</i> (рицина)	1188	1413
<i>Bertholletia excelsa</i> (бразильський горіх)	2010	2392
<i>Persea americana</i> (авокадо)	2217	2638
<i>Cocos nucifera</i> (кокос)	2260	2689
<i>Elaeis guineensis</i> (олійна пальма)	5000	5950
Мікроводорості	79300	95000

Вперше переестерифікація рослинної олії була виконана ще у 1853 р. Е. Даффі і Дж. Патриком задовго до появи першого дизельного двигуна, який був випробуваний Рудольфом Дизелем 10 серпня 1893 р. У перших моделях Р. Дизель використовував в якості палива арахісову олію (Shay, 1993) вважаючи, що біологічні палива в майбутньому набудуть такого ж значення, як і нафта. На згадку про це 10 серпня був оголошений “Міжнародним днем біодизелю”. До 20-х років XX ст. у дизельних двигунах використовували рослинні олії, але потім вони були замінені дизельними паливами з нафти, які виявилися набагато дешевшими, мали нижчу в’язкість і, на відміну від олії, не призводили до частого коксування інжекторів, камер згоряння і клапанів. Спроби поліпшити експлуатаційні характеристики олійних палив шляхом нагріву, змішування з етанолом, піролізу і крекінгу олії були невдалими.

У 1931 р. Г. Шаван (Бельгія) запатентував “Спосіб трансформації рослинних олій для їх застосування в якості дизельного палива” (фр. “Procédé de Transformation d’Huiles Végétales

en Vue de Leur Utilisation comme Carburants” Бельгійський патент 422,877). Автор описав алкоголіз (процес, який частіше називають трансестерифікацією) рослинних олій з використанням метанолу і етанолу для відокремлення жирних кислот від гліцерину і заміни гліцерину на короткі залишки аліфатичних спиртів. Значно пізніше, у 1977 р., бразильський вчений Е. Парене виготовив біодизель через трансестерифікацію рослинної олії етанолом і отримав патент на цю технологію. Він заснував компанію Tecbio, яка сумісно з НАСА і компанією Боїнг зараз працює над сертифікацією біогасу – іншого продукту, який виготовляється за його патентом.

Дослідження по використанню трансестерифікованої соняшникової олії і стандартизації продукту як дизельного палива були розпочаті в Південній Африці в 1979 р. За їх технологією австрійська компанія Gaskoks побудувала першу в Європі пілотну установку в 1987 р. і перший завод у 1989 р. (з обсягом переробки 30 000 т насіння ріпаку на рік).

5.5.1. Технологія виробництва біодизелю

В основі технології виготовлення біодизелю лежить двостадійний хімічний процес гідролізу і трансестерифікації тригліцеридів рослинних олій або інших жирів (Ma, Hanna, 1999; Meher et al., 2006). На першому етапі відбувається розрив естерного зв'язку між гідроксигрупами гліцерину і карбоксигрупами жирних кислот, каталізований лугом. Друга стадія процесу полягає в утворенні естерів між вивільненими жирними кислотами (стеариною, олеїною, пальмітиною, лінолевою та ін.) і наявним у реакційному середовищі аліфатичним спиртом – метанолом, рідше етанолом або ізопропанолом (рис. 5.9).

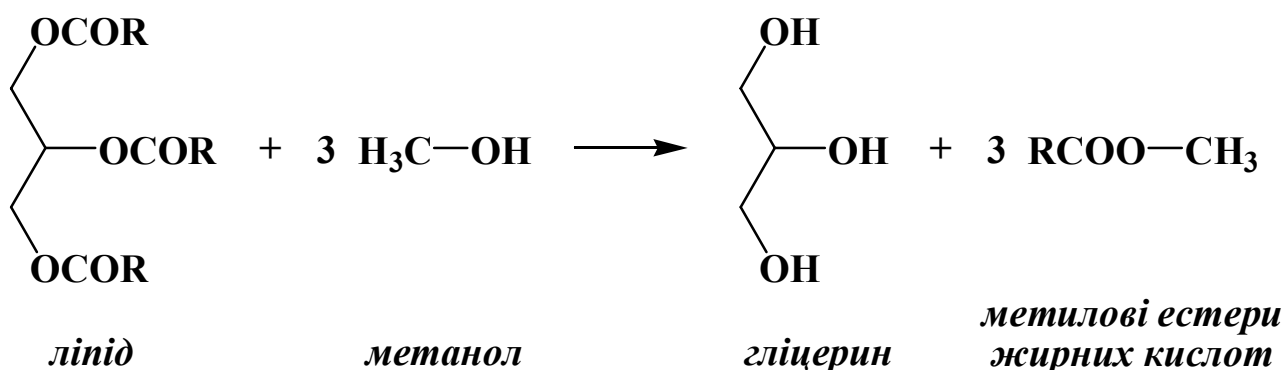


Рис. 5.9. Схема хімічних реакцій переестерифікації ліпідів.

У процесі реакції олія нагрівається до температури 60-65 °С і додається суміш каталізатора і спирту. Деякий час суміш перемішується і відстоюється. У результаті успішної

реакції суміш повинна розшаруватися, причому біодизель переходить у верхній шар, у центрі утворюється шар, що містить багато мила, і на дні залишається гліцерин. Гліцерин і мильний шар потім відокремлюють, а біодизель промивають різними способами для видалення залишків мила, каталізатора та інших можливих домішок. Після промивок біодизель зневоднюють для видалення залишків води. При звичайній температурі реакція протікає дуже повільно або зовсім не йде. Нагрівання, так само як і додавання кислоти, сприяє прискоренню реакції (Meka et al., 2006).

При використанні відпрацьованих рослинних олій необхідна фільтрація сировини для видалення можливих домішок. Також важливим є видалення надлишків води для запобігання гідролізу тригліцеридів і утворенню солей жирних кислот замість реакції трансестерифікації та утворення біодизелю. У кустарних умовах це часто досягається простим нагріванням суміші до 120 °C, при цьому вся наявна вода википає. Протягом цього процесу можливе розбризкування, тому для запобігання цьому операція повинна проводитися в достатньо великій ємності, заповненій не більше ніж на дві третини, нещільно закритій.

У лабораторних умовах первинне масло просто перемішується з осушником (таким як сульфат магнію) для видалення води. Після цього агент, що поглинає воду, видаляється простою фільтрацією. Іноді в'язкість масла не дозволяє добре очистити його в такий спосіб.

Екстракція ліпідів з мікроводоростей

Важливою проблемою, яку необхідно вирішувати при виробництві біодизелю з біомаси водоростей, є екстракція ліпідів (Kyle, 1992). Цей етап технології є одним з найдорожчих, тому ефективні й недорогі способи вилучення ліпідної фракції з клітин мікроводоростей значною мірою визначають рентабельність усього виробництва. Порівняно з насінням олійних культур, біомаса мікроводоростей містить набагато більше води, що потребує додаткових енергетичних витрат при підготовці сировини до екстракції.

Існують три широко відомі методи вилучення олійної фракції з біомаси:

- 1) пресування;
- 2) екстракція органічними розчинниками (найчастіше гексаном);
- 3) екстракція рідиною в суперкритичному стані (зазвичай CO₂).

Часто використовують комбінацію механічного пресування й хімічних розчинників для вироблення олії.

При використанні потужних пресів з біомаси мікроводоростей можна видобути не більше 70 % ліпідної фракції.

Більш ефективним способом є вилучення мембранних ліпідів за допомогою органічних розчинників. Використовують бензол, ефір і, головним чином, відносно недорогі гексан або

харчові бензини (Xiong et al., 2008). Екстракцію ліпідів з мікроводоростей органічними розчинниками можна провести шляхом багаторазових промивань біомаси розчинником при температурі його кипіння в скляному апараті Сокслета або на скляному фільтрі (Schäfer, 1998). Цей спосіб є набагато дорожчим, ніж проста гексанова екстракція. Після вилучення основної кількості ліпідів, їх залишок може бути екстрагований за допомогою обробки циклогексаном. За рахунок такої двостадійної екстракції з біомаси можна видобути до 95 % ліпідів.

У лабораторній практиці, коли обов'язковою вимогою є якомога повніше вилучення ліпідів з вихідного матеріалу, рекомендується застосовувати суміш неполярного розчинника, такого як хлороформ, бензол чи гексан, з полярним розчинником, найчастіше спиртом (метанолом, етанолом, ізопропанолом) (Кейтс, 1975). Використання неполярних розчинників потрібне для руйнування комплексів ліпідів з іншими сполуками, утворених у результаті ван-дер-ваальсової гідрофобної взаємодії. Спирти ж розривають водневі зв'язки, порушують електростатичну взаємодію ліпідів з білками і дезактивують ліполітичні ферменти, проте разом з ліпідами вони екстрагують і речовини неліпідної природи, такі як цукри, амінокислоти, солі і т. п. Для екстракції ліпідів з будь-якого біологічного матеріалу, зокрема з мікроводоростей, загальноживаними є класична методика Фолча та її дещо спрощений варіант, який не потребує використання великих кількостей розчинників, – метод Блайя і Дайєра. В обох випадках вилучення ліпідів проводиться за допомогою однофазної суміші хлороформ – метанол – вода. Наступним обов'язковим етапом є очищення екстракту. Після додавання певних кількостей хлороформу і води система розділяється на дві фази, при цьому водорозчинні неліпідні домішки переходять у верхній водно-метанольний шар, а ліпіди, практично вільні від забруднень, залишаються в нижній хлороформній фазі. Ці лабораторні препаративні методики потребують попереднього руйнування клітинних стінок мікроводоростей і не підходять для промислового використання через велику тривалість процедури.

Значно прискорити процеси екстракції може обробка ультразвуком. В УЗ-диспергаторі ультразвукові хвилі створюють пухирі кавітацій у матеріалі, що має розчинитися. Коли ці пухирі руйнуються біля стінок клітин, ударні хвилі, що виникають, порушують цілісність клітин, і клітинний вміст вивільняється в розчинник. Іншим способом порушення міцних клітинних стінок мікроводоростей є так званий осмотичний шок – раптове зниження осмотичного тиску, яке може викликати розрив клітин. Осмотичний шок іноді використовується, щоб вивільнити клітинні компоненти, зокрема жири.

Суттєвим обмеженням для використання розчинників є їхня шкідливість для організму людини, пожежна і вибухова небезпека.

Дуже ефективно розчиняє ліпіди зріджений під тиском CO_2 . У суперкритичному стані, тобто при температурах і тисках, які перевищують критичні значення, вуглекислота набуває надзвичайних рис, поєднуючи властивості як рідини, так і газу. Вона може проникати крізь тверді тіла, як газ, і розчиняти матеріали, як рідина. Спочатку вуглекислота через свою нетоксичність привернула до себе увагу фармакологів, і набула поширення в технологіях обробки лікарської сировини. Але використання екстрагентів у суперкритичному стані вимагає наявності дуже коштовного спеціального обладнання, яке дозволяє працювати при високих тисках. Перевагою цього способу екстракції є те, що після закінчення процесу тиск в апараті може бути знижений, і CO_2 випаровується, залишаючи, таким чином, чисту олійну фракцію.

Крім вищезгаданих, слід відмітити й такий спосіб вилучення ліпідів, як ферментна екстракція (Akoh et al., 2007). У цьому випадку використовуються ферменти, які порушують стінки клітин у водному середовищі, що полегшує відокремлення ліпідів від біомаси. Цей спосіб також потребує набагато більших витрат, ніж гексанова екстракція.

Стадії процесу приготування біодизелю

Основні етапи процесу виготовлення біодизелю наведені на рис. 5.10.

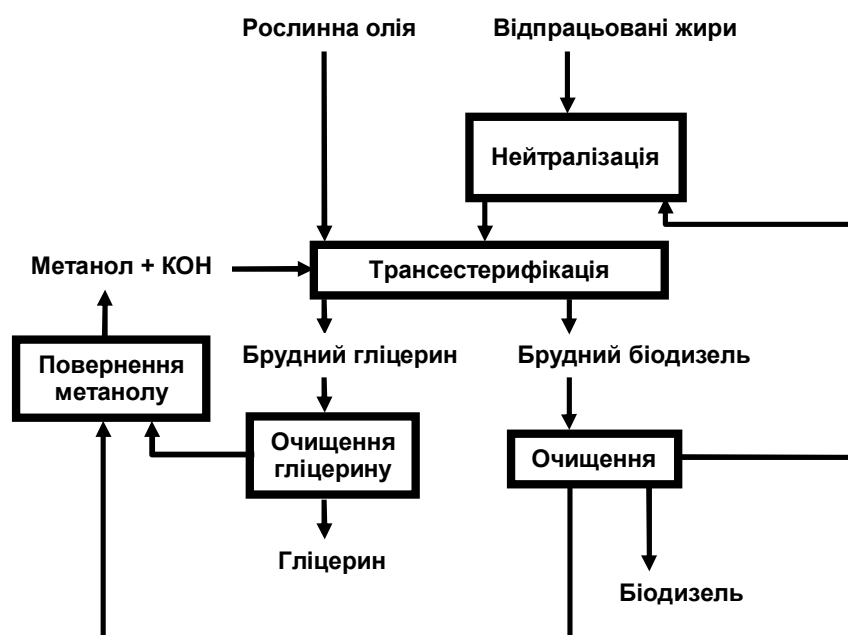


Рис. 5.10. Технологічна схема процесу отримання біодизелю.

Нейтралізація вільних жирних кислот. Титрування масла

При застосуванні свіжої рослинної олії кількість лугу, що додається, є постійною і складає близько 1 % від ваги олії (3,5 г на 1 л рослинної олії). Але при використанні відпрацьованого масла, яке має інший вміст вільних жирних кислот і тому більше закислює

реакційну суміш, необхідно розрахувати кількість лугу, що має бути доданий, для чого проводять титрування. При титруванні використовується ізопропіловий спирт, оскільки він не реагує з маслом. Необхідно провести щонайменше три титрування, щоб уникнути потім помилок при використанні великих кількостей реактивів. Титруванням визначається кількість вільних жирних кислот, присутніх в олії, і кількість лугу, необхідна для їх нейтралізації. У процесі титрування треба бути впевненим, що всі речовини сухі, і враховувати, що в результаті суміш трохи нагріється.

Трансестерифікація

Розраховану кількість лугу (зазвичай гідроксиду натрію – NaOH) після титрування поволі при помішуванні розчиняють у надлишку спирту (для повнішого протікання реакції), і ця суміш змішується з підігрітою олією при нагріванні (зазвичай близько 50 °C) протягом декількох (4-8) годин для проходження реакції трансестерифікації. З одної тонни рослинної олії та 111 кг спирту (в присутності 12 кг каталізатора) синтезується приблизно 970 кг (1100 л) біодизелю і 153 кг первинного гліцерину (Ma, Hanna, 1999). Температура реакційної суміші повинна підтримуватися вищою за точку кипіння спирту (близько 70 °C), але в деяких системах з міркувань безпеки рекомендується підтримувати діапазон температур від кімнатної до 55 °C. Звичайний час реакції складає від 1 до 10 годин, і за нормальних умов швидкість реакції подвоюється при підвищенні температури реакції на 10 °C. Для запобігання випаровуванню спирту реакцію потрібно проводити в закритій ємності, але важливо уникати щільно закритої системи (для попередження небезпеки вибуху). Після завершення реакції на дні осідає гліцерин. Біодизель повинен бути медового кольору, а гліцерин – темнішим. При підтримці температури близько 38 °C гліцерин залишається в рідкому стані і може бути легко видалений крізь отвір унизу змішувача за допомогою окремого шланга.

Гліцерин, отриманий з відпрацьованих олій, зазвичай має коричневий колір і твердне при температурі 38 °C, гліцерин зі свіжої олії залишається в рідкому стані при нижчих температурах. Його можна з успіхом використовувати як побічний продукт, заздалегідь випарувавши з нього метанол нагріванням до 65,5 °C.

Очищення продукту

Після завершення реакції переестерифікації вміст метилових естерів повинен бути вищим за 96 %. Укрась шкідливо для двигунів використовувати метилові естери жирних кислот без попереднього очищення від продуктів омилення і залишкового метанолу. Мило засмічує фільтри, а залишковий метанол знищує поршневу групу і клапани двигуна. Для очищення треба застосовувати не лише сепарацію і центрифугування, але також промивати водою і використовувати сорбенти.

Зазвичай отриманий біодизель містить багато розчинених залишків мила, яке утворюється при взаємодії вільних жирних кислот з іонами натрію в присутності води. Цього можна уникнути, випарувавши заздалегідь усю воду і прагнучи не допускати її присутності в процесі трансестерифікації. Після закінчення реакції краще дати суміші відстоятися протягом тижня, тоді всі мильні залишки осідають і видаляються при подальшій фільтрації. Інший метод полягає в неодноразовому промиванні водою цих залишків. При першому промиванні краще додати злегка підкислену оцтом воду: кислота доведе рН розчину до нейтрального, видаляючи будь-який луг, присутній у ньому. Деякі експериментатори використовують техніку “бульбашкового промивання”, тривалістю близько 12 годин.

При використанні етанолу часто утворюється емульсія, якої можна позбавитися простим відстоюванням, центрифугуванням або додаванням низькокиплячого неполярного розчинника, з подальшою фільтрацією. Верхній шар (суміш біодизелю і спирту) фільтрується. Надлишок спирту можна видалити в процесі випарювання або дистиляції, або ж екстрагувати водою, проте в цьому разі біодизельна суміш надалі повинна бути осушена за допомогою агента, що поглинає воду.

5.5.2. Визначення якості біодизелю

Якість продукту визначається, перш за все, наочно, а також перевіркою рН. Значення рН повинне бути нейтральним, близько 7,0. На вигляд біодизель повинен виглядати, як чиста соняшникова олія (Mecka et al., 2006). Не допускається наявність жодних суспензій, домішок, частинок або помутнінь. Каламутність означає, що в продукті присутня вода, яку видаляють нагріванням; частинки необхідно відфільтровувати крізь 5-мікронний фільтр. Після першого застосування біодизелю обов'язково слід перевірити паливні фільтри. Існує безліч різних технологій первинного очищення масла за допомогою адсорбентів. Також використовуються різні адсорбенти при очищенні (промиванні) готового біодизелю. Необхідно використовувати фільтри для очищення води після промивання біодизелю, які усувають типові забруднювачі – спирти, кетони, альдегіди, аміни й аміак, пестициди і гербіциди, хлорорганічні сполуки, феноли і масла, SO₂, вуглеводні, леткі сполуки, сірководень, меркаптани і промислові розчинники, інші забруднювачі. При зберіганні біодизелю більше 3 місяців він розкладається.

Якість біодизелю визначається за відповідністю національним стандартам, які дещо відрізняються в різних країнах (табл. 5.10).

Таблиця 5.10. Стандарти на біодизель (Knothe, 2006; Biodiesel Handling and Use Guidelines, 2006; European Biodiesel Board, 2007)

	Одиниці	ЄС	Німеччина	США	Петродизель
Специфікація		EN 14214:2003	DIN V 51606	ASTM D6751	EN 590:1999
Умовна назва		FAME (Fatty Acid Methyl Esters)	FAME	FAAE	Diesel
Щільність 15 °C	г/см ³	0,86-0,90	0,875-0,90		0,82-0,845
В'язкість 40 °C	мм ² /с	3,5-5,0	3,5-5,0	1,9-6,0	2,0-4,5
Точка займистості	°C	≥ 120	≥ 110	≥ 130	≥ 55
Вміст сірки	мг/кг	≤ 10	≤ 10	≤ 15	≤ 350
Вуглецевий залишок (10 % донного залишку)	мас. %	≤ 0,3	≤ 0,3		≤ 0,3
Сульфатована зола	мас. %	≤ 0,02	≤ 0,03	≤ 0,02	
Оксидна зола	мас. %				≤ 0,1
Вода	мг/кг	≤ 500	≤ 300	≤ 500	≤ 200
Загальне забруднення	мг/кг	≤ 24	≤ 20		≤ 24
Корозія мідної смужки	год./50 °C	≤ 1	≤ 1	≤ 3	≤ 1
Стійкість до окиснення	год. (при 110 °C)	≥ 6			- (25 г/м ³)
Цетанове число		≥ 51	≥ 49	≥ 47	≥ 51
Кислотне число	мг КОН / г	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,8	
Вміст метанолу	мас. %	≤ 0,2	≤ 0,3		
Вміст естерів	мас. %	≥ 96,5			
Моногліцериди	мас. %	≤ 0,8	≤ 0,8		
Дигліцериди	мас. %	≤ 0,2	≤ 0,4		
Тригліцериди	мас. %	≤ 0,2	≤ 0,4		
Вільний гліцерин	мас. %	≤ 0,02	≤ 0,02	≤ 0,02	
Загальний гліцерин	мас. %	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,24	
Йодне число		≤ 120	≤ 115		
Метиллінолеат	мас. %	≤ 12			
Поліненасичені жирні кислоти (≥ 4 подвійних зв'язків)	мас. %	≤ 1			
Фосфор	мг/кг	≤ 10	≤ 10	≤ 10	
Лужність	мг/кг		≤ 5		
Лужні метали (Na, K)	мг/кг	≤ 5			
Лужноземельні метали (Ca, Mg)	мг/кг	≤ 5			

Біодизель є сумішшю естерів 6 або 7 жирних кислот, які переважно містяться в оліях. Властивості цих естерів можуть дуже відрізнятися за показниками щільності, в'язкості, температури плавлення, теплотворної здатності, ступеня ненасиченості та ін. Оскільки різні рослинні олії містять різні типи жирних кислот, на властивості біодизелю вирішальним чином буде впливати вибір вихідної сировини. У табл. 5.11 наведені характеристики метилових естерів чотирьох найбільш розповсюджених жирних кислот, які входять до складу біодизелів різного походження.

Таблиця 5.11. Фізичні властивості індивідуальних метилових естерів жирних кислот (Van Gerpen, 2005)

Естер	Щільність, г/см ³ (15 °С)	В'язкість, мм ² /с	Цетанове число	Теплотворна здатність, кДж/кг	Температура плавлення, °С
Пальмітат	0,867	4,37	74	39,4	30,6
Стеарат	0,867	5,79	75	40,1	39,1
Олеат	0,878	4,47	55	39,9	-19,8
Лінолеат	0,890	3,68	33	39,7	-35,0

Хімічний склад і властивості біодизелю залежать від довжини та ступеня ненасиченості вуглецевого ланцюга жирних кислот. Жирні кислоти, що входять до складу рослинних олій, поділяють на насичені і ненасичені. Насичена кислота, на відміну від ненасиченої, не здатна до хімічної реакції з воднем, у той час як ненасичена може бути гідрогенізована. Насичені кислоти мають більш високу точку замерзання. Температура кипіння жирної кислоти залежить від довжини вуглецевого ланцюга і не залежить від ступеня ненасиченості. Вплив хімічної структури на температури плавлення та кипіння жирних кислот та їх метилових естерів можна побачити з даних табл. 5.12.

Біодизель являє собою рідину від жовтого до коричневого кольору, залежно від сировини, з якої був виготовлений продукт. Щільність біодизелю менша, ніж у води, і становить 0,88 г/см³. Він практично не змішується з водою, має високу точку кипіння і низький тиск пари. В'язкість біодизелю приблизно така ж, як у петродизелю – продукту, який походить від нафти.

Типові метилові естери, з яких складається біодизель, мають точку спалахування близько 150 °С. Точка займистості для біодизелю перевищує 150 °С, що робить біопаливо відносно безпечним. Характеристикою займистості дизельних палив є цетанове число.

Таблиця 5.12. Температури плавлення та кипіння жирних кислот різного хімічного складу і їх метилових естерів (Van Gerpen et al., 2004)

Жирна кислота	Кількість атомів вуглецю	Формула	Кислота		Метиловий естер	
			Температура			
			плавлення, °C	кипіння, °C	плавлення, °C	кипіння, °C
Каприлова	8	CH ₃ (CH ₂) ₆ COOH	16,7	239,7	-40	193
Капринова	10	CH ₃ (CH ₂) ₈ COOH	31,6	270,0	-18	224
Лауринова	12	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH	44,2	304	5,2	262
Міристинова	14	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH	53,9	332	19	295
Пальмітинова	16	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH	63,1	349	30	338
Пальмітоолеїнова	16	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	0	-	0	-
Стеаринова	18	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH	69,6	371	39,1	352
Олеїнова	18	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	16,3	-	-19,9	349
Лінолева	18	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	-5	-	-35	366
α-Ліноленова	18	CH ₃ CH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	-11	-	-	-
Арахінова	20	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COOH	76,5	-	50	-
Ейкозенова	20	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₉ COOH	23	-	-15	-
Бегенова	22	CH ₃ (CH ₂) ₂₀ COOH	81,5	-	54	-
Ерукова	22	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₁₁ COOH	34,7	-	-	-

Цетанове число кількісно дорівнює об'ємній частці цетану ($C_{16}H_{34}$, гексадекану), цетанове число якого приймається за 100, у суміші з α -метилнафталіном (цетанове число якого, у свою чергу, дорівнює 0). Коли дизельне паливо характеризується такою ж займистістю, яка визначена на дослідному двигуні (ASTM D 613, EN 5165, ISO 5165, ГОСТ 3122), що і модельна суміш цих двох вуглеводнів, цетанове число даного палива вважається рівним відсотковій частці цетану в цій суміші. Чим воно більше, тим краще займистість палива при стисненні.

Оптимальну роботу стандартних двигунів забезпечують дизельні палива з цетановим числом 40-55. При цетановому числі меншому ніж 40 різко зростає затримка займання (час між початком уприскування і займанням палива) і швидкість наростання тиску в камері згоряння, збільшується зношення двигуна. Стандартне паливо має цетанове число 40-45, а паливо вищої якості – 45-50.

Дизельне паливо преміум-класу більш легке, містить більше легкозаймистих легких фракцій і тому придатніше для запуску двигуна в холодну погоду; крім того, відношення водню до вуглецю в легких фракціях вище, тому при згорянні такого дизельного палива утворюється менше диму.

Якщо цетанове число вище за 60, то паливо не згорає повністю, зростає димність вихлопних газів, підвищуються витрати палива. Для мінерального дизпалива цетанове число дорівнює 42-45, а для біодизелю (метиловий естер) не менше 51.

Суміш дизельного палива з біодизелем позначається літерою В; цифра при літері означає процентний вміст біодизелю: В2 – 2 % біодизелю і 98 % дизельного палива, В100 – 100 % біодизелю (Manuel, 2007). Застосування біодизелю або сумішей не вимагає внесення змін у двигун.

5.5.3. Екологічні аспекти застосування і виробництва біодизелю

Біодизель не токсичний, якщо він не забруднений реактивами, які використовувалися під час його виготовлення. Як показали досліді, біодизель при потраплянні у воду не заподіює шкоди рослинам і тваринам (Gupta, Raghava, 2007). Крім того, він піддається практично повному біологічному розпаду: в ґрунті або у воді мікроорганізми за 28 днів переробляють 99 % біодизелю, що дозволяє говорити про мінімізацію забруднення річок і озер (Robertson et al., 2000).

Застосування біодизельного палива призводить до скорочення викидів CO_2 (Manuel, 2007). При згорянні біодизелю виділяється точно така ж кількість вуглекислого газу, яку

було спожито з атмосфери рослиною, початковою сировиною біодизелю, за весь період її життя. Біодизель порівняно зі звичайним дизельним паливом майже не містить сірку.

Під виробництво сировини для біодизелю відчужуються великі земельні площі, на яких нерідко використовують підвищені дози засобів захисту рослин. Це призводить до біодеградації ґрунтів і зниження їх якості. Проте макуха, яку одержують при виробництві рослинної олії, використовується як корм для худоби, що дозволяє більш повно утилізувати біомасу рослини. Виробництво біодизелю дозволяє ввести в обіг невикористовувані землі, створити нові робочі місця в сільському господарстві, машинобудуванні, будівництві і т. д. Так, у США на вільних землях щорічно можна вирощувати 1,3 млрд т біомаси.

Біодизель має добрі мастильні характеристики. Мінеральне дизпаливо при усуненні з нього сірчистих сполук втрачає свої мастильні властивості. Біодизель, незважаючи на значно менший вміст сірки, характеризується високою мастильною здатністю, що продовжує термін життя двигуна. Це викликане його хімічним складом і вмістом у ньому кисню. При роботі двигуна на біодизелі одночасно проводиться змащування його рухомих частин, унаслідок чого, як показують випробування, досягається збільшення терміну служби самого двигуна і паливного насоса в середньому на 60 %. Важливо відмітити, що при цьому немає необхідності модернізувати двигун. Ще одною цінною характеристикою біодизелю є висока температура займання.

Побічним продуктом виробництва біодизельного палива є гліцерин. Його можна використовувати в багатьох галузях. Очищений гліцерин застосовують для виробництва технічних миючих засобів (наприклад, мила). Після глибокого очищення отримують фармакологічний гліцерин, тонна якого на ринку коштує близько 1 тис євро. При додаванні фосфорної кислоти до гліцерину можна отримати фосфорні добрива.

Недоліком біодизелю є те, що в холодну пору року необхідно підігрівати паливо, яке надходить з паливного бака в паливний насос, або застосовувати суміш, 20 % якої складає біодизель і 80 % – соляр (марка B20) (Krawczyk, 1996).

5.5.4. Виробництво біодизелю з водоростей

Мікроводорості вважаються найбільш перспективним джерелом сировини для виробництва біодизелю. З одного гектара землі можна отримати 446 л соєвої олії, або 2690 л пальмової. З такої ж площі водної поверхні можна отримувати до 90 000 л біодизелю. Але потенційні переваги використання мікроводоростей для отримання біодизелю ще не можуть бути реалізовані повною мірою через відсутність ефективних систем культивування і збору, а також розвинутої інфраструктури з переробки мікроводоростей.

Вміст ліпідів у клітинах мікроводоростей залежить від виду культури й умов вирощування (див. розділ 5.3). Дуже сильно впливають на хімічний склад мікроводоростей інтенсивність освітлення, температура і доступність поживних речовин (Li et al., 2007; Xiong et al., 2008). У табл. 5.13 наведені дані про хімічний склад різних видів мікроводоростей. Видно, що найбільший вміст ліпідів мають одноклітинні примнезієві та зелені водорості, такі як *Prymnesium parvum*, *Scenedesmus dimorphus* або *Chlorella vulgaris*.

Таблиця 5.13. Хімічний склад біомаси мікроводоростей, % маси сухої речовини (Metting, 1996; Spolaore et al., 2006)

Вид	Білки	Вуглеводи	Ліпіди
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2
<i>Spirogyra</i> sp.	6-20	33-64	11-21
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20
<i>Prymnesium parvum</i>	28-45	25-33	22-38
<i>Tetraselmis maculata</i>	52	15	3
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	5-10
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-8
<i>Synechococcus</i> sp.	63	15	11
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7

Якість біодизелю, як було сказано вище, залежить від жирнокислотного складу вихідної сировини. У табл. 5.14 порівнюється склад жирних кислот рослинних олій та мікроводоростей. З насичених жирних кислот у складі водоростей переважає пальмітинова кислота, з ненасичених – пальмітоолеїнова (16:1) і ліноленова (18:3). Загальна ненасиченість жирних кислот ліпідів мікроводоростей значно вища, ніж у пальмової олії, але поступається соєвій олії. Слід зауважити, що жирнокислотний склад ліпідів мікроводоростей може дуже змінюватися при варіюванні умов вирощування. Так, зниження температури культивування, так само як і підвищення рівня освітленості, призводить до зростання частки ненасичених жирних кислот у хімічному складі водоростей.

Таблиця 5.14. Жирнокислотний склад (% сумарної кількості жирних кислот) соєвої і пальмової олії, та водоростей (Kushak et al., 2000)

Жирні кислоти	Соєва олія	Пальмова олія	Водорості
Каприлова (8:0)		9,7	
Капринова (10:0)		7,5	
Лауринова (12:0)		42,1	
Міристинова (14:0)		22,4	9,1
Пальмітинова (16:0)	14,69	18,2	36,6
Пальмітоолеїнова (16:1)			11,9
Маргарінова (17:0)			0,89
Стеаринова (18:0)	5,4		2,7
Олеїнова (18:1)	26,8		6,7
Лінолева (18:2)	44,4		7,4
Ліноленова (18:3)	8,0		22,3
Арахідова (20:0)	0,35	0,14	
Арахідонова (20:4)			0,65
Ейкозапентаєнова (20:5)			0,08
Бегенова (22:0)	0,33		
Насичені	20,77	100,04	49,29
Поліненасичені	52,4		30,43

В останні роки дуже зросла увага до культивування мікрowodоростей і технологій отримання біодизелю з них (Francis et al., 2005). З 1978 до 1996 рр. Департамент Енергетики США досліджував водорості з високим вмістом олії за програмою “Aquatic Species Program” (Van Gerpen, 2005). Дослідники дійшли висновку, що штати Каліфорнія, Гаваї і Нью-Мексико придатні для промислового виробництва водоростей у відкритих ставках. Протягом 6 років водорості вирощувалися в ставках площею 1000 м². Врожайність склала більше 50 г водоростей з 1 м² на день. Було встановлено, що 200 тис га ставків можуть давати паливо в кількості, достатній для річного споживання 5 % автомобілів США (200 тис га – це менше 0,1 % земель США, придатних для вирощування водоростей). Але в технології ще залишається безліч проблем. Наприклад, водоростям потрібна висока температура, для їх виробництва добре підходить пустельний клімат, але необхідна хоча б будь-яка температурна регуляція при нічних перепадах температур. Проблемою залишається вибір технологічних видів мікрowodоростей, які здатні до швидкого росту і мають високий вміст жирних кислот, а також пошук конструкцій фотобіореактора, які були б добре пристосовані до вирощування обраного виду і забезпечили рентабельність продукування сировини (Gupta, Raghava, 2007).

У 2006 р. декілька компаній оголосили про будівництво заводів по виробництву біодизелю з водоростей:

- Global Green Solutions (Канада) за технологією компанії Valcent Products (США) – потужність виробництва 4 млн барелей біонафти на рік;
- Bio Fuel Systems (Іспанія);
- De Beers Fuel Limited (ЮАР) за технологією Greenfuel Technologies Corporation (США) – потужність виробництва 900 млн галонів біодизелю на рік (водорості + соняшникова олія);
- Aquaflow Bionomic Corporation (Нова Зеландія) – потужність виробництва 1 млн л біодизелю на рік.

Наприкінці 2006 р. у Південній Африці було оголошено про початок будівництва 90 реакторів для вирощування мікроводоростей як сировини для біодизелю. Кожен з реакторів буде здатний давати 10 млн галонів біодизелю щороку. Таким чином, повна виробнича потужність становитиме 900 000 000 галонів на рік, що в 4 рази більше, ніж усе американське виробництво біодизелю в 2006 р.

ЗАВЕРШЕННЯ

До недавнього часу мікроводорості – фотосинтезуючі організми з високою швидкістю росту – розглядалися як джерело вітамінів, поліненасичених жирних кислот, природних барвників та інших цінних біологічно активних сполук і культивувалися переважно для потреб фармакології, медицини, а також для збагачення раціонів людини і тварин. З поглибленням енергетичної кризи й актуалізації пошуків альтернативних відновлюваних енерготехнологій стрімко зростає увага до мікроводоростей як до "енергетичної" сировини.

Сучасна енергетика базується на спалюванні викопних вуглецевмісних палив і пов'язана з викидами в атмосферу величезних кількостей парникових газів, а також кислотоутворюючих оксидів азоту і сірки, що завдають прямої шкоди навколишньому середовищу. Вуглекислий та інші гази, які утворюються при згорянні вугілля, нафти, торфу викликають парниковий ефект, призводять до глобальних змін клімату, що загрожують усьому живому на Землі. Людство щорічно споживає біля $5 \cdot 10^{20}$ Дж енергії, і, згідно з оцінками експертів, запаси викопних палив будуть вичерпані вже через 50-100 років. Вичерпання копалин, розвиток парникового ефекту і загроза необоротного забруднення навколишнього середовища спонукають до термінових пошуків альтернативних джерел енергії, заснованих на використанні поновлюваних ресурсів, зокрема, енергії Сонця.

Природною біологічною машиною, яка здатна перетворювати сонячну енергію на доступний енергетичний ресурс, є фотосинтез рослин і водоростей. За рахунок фотосинтезу в біомасі фіксується до $1,6 \cdot 10^{21}$ Дж – величина на порядок більша за сучасне споживання енергії, і лише 10 % енергії, що запасається фотосинтезом щорічно, використовується зараз для господарчих потреб. В зв'язку з цим, головним завданням альтернативної відновлюваної енергетики є використання значно більших обсягів біомаси в якості джерела енергії. Вважають, що це забезпечить неруйнівний тип господарювання, збереження цінних копалин для майбутніх поколінь, сприятиме покращенню екологічного становища. Біопалива здатні до біодеструкції – при потраплянні у воду чи ґрунт біодизельне паливо, наприклад, зазнає практично повного біорозпаду менш, ніж за місяць; палива біологічного походження не містять у своєму складі сірку і, відповідно, викиди не містять діоксиду сірки. При згорянні біопалив виділяється така ж кількість вуглекислого газу, яка була поглинута з атмосфери рослиною – вихідною сировиною для виробництва олії чи етанолу – за весь період її життя. Підсумкове зниження викидів CO_2 в атмосферу і, як наслідок, призупинення глобального потепління є дуже суттєвою перевагою біопалив.

Однак, вже протягом першого десятиріччя спроби підвищити частку біопалива в енергобалансі розвинутих країн, у першу чергу США і ЄС, за рахунок споживання

біодизельного пального і біоетанолу, вироблених із харчової сировини, призвели до подорожчання продуктів харчування. Через це стало зрозуміло, що спрямування величезних обсягів врожаю сільськогосподарських культур на виробництво біопалива може в перспективі призвести до глобальної продовольчої кризи. Крім того, перехід на інтенсивне вирощування таких промислових культур як кукурудза або рапс для задоволення енергетичних потреб промисловості створює величезне навантаження на ґрунти, підриваючи їх родючість.

Альтернативою їстівним культурам є промислове вирощування мікроводоростей. Водорості є значно продуктивнішими об'єктами порівняно з вищими рослинами, вони більш ефективно використовують сонячне світло. Культивування водоростей може бути організовано на невіддях з використанням води невисокої якості. Важливим є також те, що водорості містять значну кількість ліпідів і жирних кислот як компонентів фотосинтезуючих мембран, запасних сполук і метаболітів. За умов наявності розвиненої інфраструктури вартість вирощування, збору і транспортування врожаю мікроводоростей може бути нижчою, ніж для звичайних сільськогосподарських культур. Однак до теперішнього часу для культивування мікроводоростей в Україні ще не створено необхідних промислових потужностей. Практично єдиним прикладом успішного вирощування товарних партій біосировини лишається виробництво синьозеленої водорості *Spirulina platensis*. Тому розробка й налагодження біореакторів для продукування мікроводоростей як просто неба з використанням прямого сонячного світла, так і в закритих приміщеннях при штучному освітленні є найважливішим завданням на сьогодні. Треба також вирішувати численні технологічні питання, пов'язані з оптимізацією світлового режиму, збором і переробкою біомаси.

Майже всі сценарії, які пропонуються спеціалістами з енергетики, передбачають вже в найближчому майбутньому значне зростання внеску біоенергії в забезпечення глобальних потреб. Біомаса, як вважають, може стати основним джерелом енергії в країнах, що розвиваються, які мають великі території, наприклад, у Бразилії, Китаї та Індії. Очевидно, що для України, яка має багато екологічних і енергетичних проблем, розвиток альтернативних, екологічно безпечних біотехнологій отримання енергії з біомаси повинен вважатися пріоритетним завданням. Для його вирішення, крім існуючих зараз виробництв біоетанолу і біопалива з рослинних олій, дуже корисним може стати розвиток технологій, заснованих на переробці мікроводоростей, які дозволять використовувати непридатні для сільськогосподарського освоєння площі і отримувати недорогу біоенергію.

ЛІТЕРАТУРА

- Амосова К.М., Кротенко О.В., Широбоков В.П., Конопльова Л.Ф., Брюзгіна Т.С., Афоніна Г.Б. Ліпідкоригуюча та імуномодуюча ефективність нового вітчизняного препарату текому при лікуванні нестабільної стенокардії // Укр. кардіол. журн. – 2000. – № 1-2. – С. 31-36.
- Андреюк Е.И., Коптева Ж.П., Занина В.В. Цианобактерии. – К.: Наук. думка, 1990. – 197 с.
- Басова М.М. Жирнокислотный состав липидов некоторых видов микроводорослей // Альгология. – 2005. – **15**, № 4. – С. 415-436.
- Биохимия синезеленых водорослей / Е.Г. Судьина, Е.И. Шнюкова, Н.В. Костлан, П.А. Мушак, Н.Д. Тупик; Под ред. К.М. Сытника. – К.: Наук. думка, 1978. – 261 с.
- Біохімія червоних водоростей / О.Г. Судьіна, Є.І. Шнюкова, П.О. Мушак та ін.; Під ред. О.К. Золотарьової. – К.: Авокадо, 2007. – 320 с.
- Бойченко В.А. Действие аноксии на активность фотосистемы II у хлореллы: роль гидрогеназной системы // Физиол. раст. – 1980. – **27**, № 1. – С. 42-51.
- Борисова Е.Б., Царенко П.М. Коллекция культур водорослей отдела споровых растений Института ботаники им. М.Г. Холодного НАН Украины (IBASU-A) // Альгология. – 1997. – **7**, № 4. – С. 431-439.
- Бородин В.Б., Цыганков А.А., Рао К.К., Холл Д.О. Фотообразование водорода культурой *Anabaena variabilis* PK84 // Физиол. раст. – 2000. – **47**, № 5. – С. 768-773.
- Варфоломеев С.Д., Калюжный С.В. Биотехнология: кинетические основы микробиологических процессов. – М.: Высш. шк., 1990. – 296 с.
- Визначник прісноводних водоростей Української РСР. Вип. I. Синьозелені водорості – Cyanophyta. Ч. I. Загальна характеристика синьозелених водоростей / Н.В. Кондратьєва, О.В. Коваленко, Л.П. Приходькова; Під ред. Н.В. Кондратьєвої. – К.: Наук. думка, 1984. – 388 с.
- Водоросли. Справочник / С.П. Вассер, Н.В. Кондратьева, Н.П. Масюк и др.; Под ред. С.П. Вассера – К.: Наук. думка, 1989. – 405 с.
- Волова Т.Г. Биотехнология / Отв. ред. И.И. Гительзон. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 1999. – 252 с.
- Волова Т.Г., Терсков И.А., Сидько Ф.Я. Микробиологический синтез на водороде / Под ред. Б.Г. Коврова. – Новосибирск: Наука, 1985. – 115 с.
- Волова Т.Г., Калачева Г.С., Жила Н.О., Плотников В.Ф. Исследование физиолого-биохимических свойств зеленой водоросли *Botryococcus braunii* // Докл. РАН. – 1998. – **361**, № 2. – С. 256-259.

- Волова Т.Г., Дегерменджи А.Г., Жила Н.О., Калачева Г.С. Структура углеводов *Botryococcus*, выделенной из озера Шира // Там же. – 2001. – **378**, № 5. – С. 703-707.
- Гоготов И.Н., Косяк А.В., Крупенко А.Н. Образование водорода цианобактериями *Anabaena variabilis* в присутствии света // Микробиология. – 1976. – **45**, № 6. – С. 941-945.
- Голлербах М.М. Косинская Е.К., Полянский В.И. Синезеленые водоросли (Определитель пресноводных водорослей СССР; вып. 2). – М.: Сов. Наука, 1953. – 652 с.
- Громов Б.В. Цианобактерии в биосфере // Соросовск. Образоват. журн. – 1996. – № 9. – С. 33-39.
- Громов Б.В., Титова Н.Н. Коллекции культур водорослей лаборатории микробиологии биологического института Ленинградского университета // Культивирование коллекционных штаммов водорослей. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1983. – С. 3-57.
- Ефимцев Е.И., Бойченко В.А., Литвин Ф.Ф. Фотоиндуцирование выделения водорода водорослями и высшими растениями // ДАН СССР. – 1975. – **220**, № 4. – С. 986-989.
- Жаворонков В.А., Махоткина Т.А., Макеев П.П. // 4 Всес. конф. Управляемое культивирование микроорганизмов. Тез. докл. ОНТИ НЦБИ – 1986 – С. 113 (цит. по А.А.Циганкову, 2001).
- Ждан-Пушкина С.М. Основы роста культур микроорганизмов. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1983. – 187 с.
- Иерусалимский И.Д. Принципы регулирования скорости роста микроорганизмов // Управляемый биосинтез / Отв. ред. И.Д. Иерусалимский, Б.Г. Ковров. – М.: Наука, 1966. – С. 5-19.
- Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР. – М.: РАН, Ин-т физиол. раст., 1991. – 227 с.
- Кейтс М. Техника липидологии. – М.: Мир, 1975. – 324 с.
- Ковров Б.Г., Штоль А.А. А.с. СССР № 306733 // Б.и. – 1972. – 6. – С. 25-26.
- Козин Л.Ф., Волков С.В. Водородная энергетика и экология. – К.: Наук. думка, 2002. – 335 с.
- Кондратьева Н.В. Морфология популяций прокариотических водорослей / Под ред. С.П. Вассера. – К.: Наук. думка, 1989. – 176 с.
- Кондратьева Н.В. Флора водорослей континентальных водоемов Украины. Прокариотические водоросли: Вып. 1: Общая характеристика: Ч.1. Строение, размножение и циклы развития. – К.: Академперіодика, 1995. – 235 с.
- Кондратьева Н.В. Флора водорослей континентальных водоемов Украины. Прокариотические водоросли: Вып. 1: Общая характеристика: Ч. 2. Экология, значение, вопросы систематики. – К.: Академперіодика, 2001. – 342 с.

- Кузнецов Е.Д., Владимирова М.Г. Железо как фактор, лимитирующий рост хлореллы на среде Тамия // Физиол. раст. – 1964. – **11**, № 4. – С. 615-619.
- Культивирование коллекционных штаммов водорослей. – Л: Изд-во ЛГУ, 1983. – 150 с.
- Ладыгин В.Г. Коллекция штаммов мутантов *Chlamydomonas* Института почвоведения и фотосинтеза АН СССР Пущино / Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР. – М.: РАН, Ин-т физиол. раст., 1991. – С. 152-175.
- Ленинджер А. Основы биохимии. Т. 3. – М.: Мир, 1985. – 320 с.
- Масюк Н.П., Посудин Ю.И., Лилицкая Г.Г. Фотодвижение клеток *Dunaliella* Teod. (*Dunaliellales*, *Chlorophyceae*, *Viridiplantae*). – К.: Академперіодика, 2007. – 265 с.
- Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике / Л.А. Сиренко, А.А. Сакевич, Л.Ф. Осипов и др.; Отв. ред. А.В. Топачевский. – К: Наук. думка, 1975. – 247 с.
- Непрерывное культивирование микроорганизмов / Под ред. И. Малека, З. Фенуля. – М.: Пищ. пром-сть, 1968. – 544 с.
- Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. – М.: Мир, 1978. – 331 с.
- Полесская О.Г., Красновский А.А. Метаболизм водорода у цианобактерий // Биол. науки. – 1990. – № 5. – С. 5-9.
- Разнообразие водорослей Украины / Под ред. С.П. Вассера, П.М. Царенко // Альгология. – 2000. – **14**, № 4. – 309 с.
- Серебрякова Л.Т., Трошина О.Ю., Гоготов И.Н. Биотехнологический потенциал одноклеточной цианобактерии *Gloeocapsa alpicola* как продуцента молекулярного водорода // Мат. Междунар. науч. конф. “Биологические ресурсы и устойчивое развитие”, Пущино, Моск. обл., 29 окт. – 2 нояб., 2001. – М., 2001а. – С. 197-198.
- Серебрякова Л.Т., Трошина О.Ю., Шереметьева М.Е. Продукция молекулярного водорода одноклеточной цианобактерией *Gloeocapsa alpicola* // От современной фундаментальной биологии к новым наукоемким технологиям: Тр. конф., Пущино 24-26 октября 2001. – Пущино (Моск. обл.), 2001б. – С. 98-99.
- Сиренко Л.А., Рыбак Н.В., Паршикова Т.В., Пахомова М.Н. Коллекция живых культур микроскопических водорослей (акроним коллекции – HPDP). – К.: Фитосоциоцентр, 2005. – 54 с.
- Стейниер Р. Эдельберг Э., Ингрэм Дж. Мир микробов. Т. 2. – М.: Мир, 1979. – 332 с.
- Трошина О.Ю. Метаболизм азота и водорода у гетероцистных цианобактерий: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М. – 2000. – 21 с.
- Упитис В.В. Макро- и микроэлементы в оптимизации минерального питания микроводорослей / Отв. ред. А.Ф. Ноллендорф. – Рига: Зинатне, 1983. – 240 с.

- Цоглин Л.Н., Габель Б.Н., Фалькович Т.Н., Семененко В.Е. Фотобиореакторы закрытого типа для культивирования микроводорослей // Физиол. раст. – 1996. – **43**, № 1. – С. 149-155.
- Цыганков А.А. Лабораторные фотобиореакторы // Приклад. биохим. и микробиол. – 2001. – **37**, № 4. – С. 387-397.
- Шереметьева М.Е. Метаболизм молекулярного водорода у одноклеточных цианобактерий. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 2003. – 17 с.
- Шереметьева М.Е., Серебрякова Л.Т. Метаболизм водорода у одноклеточной цианобактерии *Gloeocapsa alpicola* // Мат. междунар. науч. конф. "Автотрофные микроорганизмы", посвящ. 75-летию со дня рожд. Е.Н. Кондратьевой (Москва, 13-15 декабря, 2000). – С. 193-194.
- Шлегель Г. Общая микробиология. – М.: Мир, 1987. – 566 с.
- Штоль А.А., Мельников Е.С., Ковров Б.Г. Расчет и конструирование культиваторов для одноклеточных водорослей. – Красноярск: Красноярск. кн. изд-во, 1976. – 96 с.
- Ahlgren G., Gustafsson I.-B., Boberg M. Fatty acid content and chemical composition of freshwater microalgae // J. Phycol. – 1992. – **28**, N 1. – P. 37-50.
- Akoh C.C., Chang S.W., Lee G.C., Shaw J.F. Enzymatic approach to biodiesel production // J. Agric. Food Chem. – 2007. – **55**, N 22. – P. 8995-9005.
- Algae of Ukraine: Diversity, Nomenclature, Taxonomy, Ecology and Geography* / Eds. P.M. Tsarenko, S. Wasser, E. Nevo. – Ruggele: A.R.L. Gartner Verlag KG, 2006. – 713 p.
- Algal culture from laboratory to pilot plant* / Ed. J.S. Burlew. – Washington, DC, USA: Carnegie Institute of Washington Publication 600, 1953. – 357 p.
- Al-Hasan R.H., Hantash F.M., Radwan S.S. Enriching marine macroalgae with eicosatetraenoic (arachidonic) and eicosapentaenoic acids by chilling // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1991. – **35**, N 4. – P. 530-535.
- Allen C.F., Good P., Holton R.W. Lipid composition of *Cyanidium* // Plant Physiol. – 1970. – **46**, N 5. – P. 748-751.
- An J.-Y., Sim S.-J., Lee J.S., Kim B.W. Hydrocarbon production from secondarily treated piggy wastewater by the green alga *Botryococcus braunii* // J. Appl. Phycol. – 2003. – **15**, N 2-3. – P. 185-191.
- Antal T.K., Lindblad P. Production of H₂ by sulphur-deprived cells of the unicellular cyanobacteria *Gloeocapsa alpicola* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 during dark incubation with methane or at various extracellular pH // J. Appl. Microbiol. – 2005. – **98**, N 1. – P. 114-120.
- Antonopoulou S., Oikonomou A., Karantonis H.C., Fragopoulou E., Pantazidou A. Isolation and structural elucidation of biologically active phospholipids from *Scytonema julianum* (cyanobacteria) // Biochem. J. – 2002. – **367**, N Pt 1. – P. 287-293.

- Antonopoulou S., Nomikos T., Oikonomou A., Kyriacou A., Andriotis M., Fragopoulou E., Pantazidou A.* Characterization of bioactive glycolipids from *Scytonema julianum* (cyanobacteria) // *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* – 2005a. – **140**, N 2. – P. 219-231.
- Antonopoulou S., Karantonis H.C., Nomikos T., Oikonomou A., Fragopoulou E., Pantazidou A.* Bioactive polar lipids from *Chroococcidiopsis* sp. (Cyanobacteria) // *Ibid.* – 2005b. – **142**, N 3. – P. 269-282.
- Apt K.E., Behrens P.W.* Commercial developments in microalgal biotechnology // *J. Phycol.* – 1999. – **35**, N 2. – P. 215-226.
- Baillez C., Largeau C., Casadevall E.* Growth and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* immobilized in calcium alginate // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1985. – **23**, N 2. – P. 99-105.
- Bandarra N.M., Pereira P.A., Batista I., Vilela M.H.* Fatty acids, sterols and α -tocopherol in *Isochrysis galbana* // *J. Food Lipids.* – 2003. – **10**, N 1. – P. 25-34.
- Beach D.H., Harrington G.W., Holz G.G.* The polyunsaturated fatty acids of marine and freshwater cryptomonads // *J. Protozool.* – 1970. – **17**, N 3. – P. 501-510.
- Becker W.* Microalgae in human and animal nutrition // *Handbook of microalgal culture* / Ed. A. Richmond. – Oxford: Blackwell, 2004. – P. 312-321.
- Behrens P.W., Kyle D.J.* Microalgae as a source of fatty acids // *J. Food Lipids.* – 1996. – **3**, N 4. – P. 259-272.
- Bell M.V., Dick J.R., Pond D.W.* Octadecapentaenoic acid in a raphidophyte alga, *Heterosigma akashiwo* // *Phytochemistry.* – 1997. – **45**, N 2. – P. 303-306.
- Bergé J.P., Debiton E., Dumay J., Durand P., Barthomeuf C.* In vitro anti-inflammatory and anti-proliferative activity of sulfolipids from the red alga *Porphyridium cruentum* // *J. Agric. Food Chem.* – 2002. – **50**, N 21. – P. 6227-6232.
- Biodiesel Handling and Use Guidelines.* Energy Efficiency and Renewable Energy. – 2006. U.S. Department of Energy. DOE/GO 102006-2288. Second Edition.
- Bradshaw S.A., O'Hara S.C.M., Corner E.D.S., Eglinton G.* Effects on dietary lipids of the marine bivalve *Scrobicularia plana* feeding in different modes // *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* – 1991. – **71**, N 3. – P. 635-653.
- Brenckmann F., Largeau C., Casadevall E., Core C., Berkaloﬀ C.* Influence of light intensity on hydrocarbon and total biomass production of *Botryococcus braunii*. Relationships with photosynthetic characteristics // *Energy from biomass* / Eds. W. Palz, J. Coombs, D.O. Hall. – London: Elsevier, 1985. – P. 722-726.

- Brockerhoff H., Yurkowski M., Hoyle R.J.O., Ackman R.G.* Fatty acid distribution in lipids of marine plankton // J. Fish. Res. Board Can. – 1964. – **21**, N 6. – P. 1379-1384.
- Brown A.C., Knights B.A., Conway E.* Hydrocarbon content and its relationship to physiological state in the green alga *Botryococcus braunii* // Phytochemistry. – 1969. – **8**, N 3 – P. 543-547.
- Bruno A., Rossi C., Marcolongo G., Di Lena A., Venzo A., Berrie C.P., Corda D.* Selective *in vivo* anti-inflammatory action of the galactolipid monogalactosyldiacylglycerol // Eur. J. Pharmacol. – 2005. – **524**, N 1-3. – P. 159-168.
- Burdge G.C., Calder P.C.* Conversion of α -linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults // Reprod. Nutr. Dev. – 2005. – **45**, N 5. – P. 581-597.
- Caers M., Coutteau P., Sorgeloos P.* Dietary impact of algal and artificial diets, fed at different feeding rations, on the growth and fatty acid composition of *Tapes philippinarum* (L.) spat // Aquaculture. – 1999. – **170**, N 3-4. – P. 307-322.
- Carlson S.E., Werkman S.H., Peeples J.M., Wilson W.M.* Growth and development of premature infants in relation to ω 3 and ω 6 fatty acid status // World Rev. Nutr. Diet. – 1994. – **75**. – P. 63-69.
- Cepák V., Lukavský J.* The effect of high irradiances on growth, biosynthetic activities and the ultrastructure of the green alga *Botryococcus braunii* strain Droop 1950/807-1 // Arch. Hydrobiol. (Suppl. Algol. Stud.). – 1994. – **72**. – P. 115-131.
- Chain R.K., Arnon D.I.* Quantum efficiency of photosynthetic energy conversion // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1977. – **74**, N 8. – P. 3377-3381.
- Chan Yong T.-P., Largeau C., Casadevall E.* Biosynthesis of non-isoprenoid hydrocarbons by the microalga *Botryococcus braunii*: evidence for an elongation decarboxylation mechanism; activation of decarboxylation // Nouv. J. Chim. – 1986. – **10**, N 12. – P. 701-707.
- Chelf P.* Environmental control of lipid and biomass production in two diatom species // J. Appl. Phycol. – 1990. – **2**, N 2. – P. 121-129.
- Chen F.* High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth // Trends Biotechnol. – 1996. – **14**, N 11. – P. 421-426.
- Cobelas M.A., Lechado J.Z.* Lipids in microalgae. A review. I. Biochemistry // Grasas y Aceites. – 1989. – **40**, N 2. – P. 118-145.
- Cohen Z.* The chemicals of *Spirulina* // *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): physiology, cell-biology and biotechnology / Ed. A. Vonshak. – London; Bristol: Taylor & Francis, 1997. – P. 175-204.
- Constantopoulos G.* Lipid metabolism of manganese-deficient algae. I. Effect of manganese deficiency on the greening and the lipid composition of *Euglena gracilis* Z // Plant Physiol. – 1970. – **45**, N 1. – P. 76-80.

- Cranwell P.A., Robinson N., Eglinton G. Esterified lipids of the freshwater dinoflagellate *Peridinium lomnickii* // Lipids. – 1985. – **20**, N 10. – P. 645-651.
- Crawford M.A. Placental delivery of arachidonic and docosahexaenoic acids: implications for the lipid nutrition of preterm infants // Amer. J. Clin. Nutr. – 2000. – **71**, N 1. – P. 275S-284S.
- Emerson R. The quantum yield of photosynthesis // Annu. Rev. Plant Physiol. – 1958. – **9**. – P. 1-24.
- European Biodiesel Board, 2007. <http://www.ebb-eu.org>
- Florin L., Tsokoglou A., Happe T. A novel type of Fe-hydrogenase in the green alga *Scenedesmus obliquus* is linked to the photosynthetic electron transport chain // J. Biol. Chem. – 2001. – **276**, N 9. – P. 6125-6132.
- Fox R.D. *Spirulina*. Production and potential. – Aix-en-Provence: Editions Edisud, 1996. – 232 p.
- Francis G., Edinger R., Becker K. A concept for simultaneous wasteland reclamation, fuel production, and socio-economic development in degraded areas in India. Need, potential and perspectives of *Jatropha* plantations // Nat. Resour. Forum. – 2005. – **29**, N 1. – P. 12-24.
- Gaffron H. Reduction of carbon dioxide with molecular hydrogen in green algae // Nature. – 1939. – **143**, N 3614. – P. 204-205.
- Gaffron H. Photosynthesis, photoreduction and dark reduction of carbon dioxide in certain algae // Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. – 1944. – **19**, N 1. – P. 1-20.
- Gaffron H., Rubin J. Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae // J. Gen. Physiol. – 1942. – **26**, N 2. – P. 219-240.
- Ghirardi M.L., Zhang L., Lee J.W., Flynn T., Seibert M., Greenbaum E., Melis A. Microalgae: a green source of renewable H₂ // Trends Biotechnol. – 2000. – **18**, N 12. – P. 506-511.
- Gill I., Valivety R. Polyunsaturated fatty acids, part 1: Occurrence, biological activities and applications // Ibid. – 1997. – **15**, N 10. – P. 401-409.
- Gordon J.M., Polle J.E.W. Ultrahigh bioproductivity from algae // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – **76**, N 5. – P. 969-975.
- Grima E.M., Pérez J.A.S., Camacho F.G., Sánchez J.L.G., Alonso D.L. n-3 PUFA productivity in chemostat cultures of microalgae // Ibid. – 1993. – **38**, N 5. – P. 599-605.
- Grima E.M., Pérez J.A.S., Camacho F.G., Sevilla J.M.F., Fernández F.G.A., Cardona J.U. Biomass and icosapentaenoic acid productivities from an outdoor batch culture of *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 640 in an airlift tubular photobioreactor // Ibid. – 1995. – **42**, N 5. – P. 658-663.
- Gupta M.N., Raghava S. Relevance of chemistry to white biotechnology // Chem. Cent. J. – 2007. – **1**, N 1. – P. 1-17.

- Gustafson K.R., Cardellina J.H. 2nd, Fuller R.W., Weislow O.S., Kiser R.F., Snader K.M., Patterson G.M., Boyd M.R.* AIDS-antiviral sulfolipids from cyanobacteria (blue-green algae) // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1989. – **81**, N 16. – P. 1254-1258.
- Hall D.O.* Photobiological energy conversion // *FEBS Lett.* – 1976. – **64**, N 1. – P. 6-16.
- Harwood J.L.* Membrane lipids in algae // *Lipids in photosynthesis: structure, function and genetics* / Eds. P.-A. Siegenthaler, N. Murata. – Dordrecht; Boston; London: Kluwer Acad. Publ., 1998. – P. 53-64.
- Harwood J.L., Jones A.L.* Lipid metabolism in algae // *Adv. Bot. Res.* – 1989. – **16**. – P. 1-53.
- Hayakawa K., Handa N., Wong C.S.* Changes in the composition of fatty acids in sinking matter during a diatom bloom in a controlled experimental ecosystem // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* – 1997. – **208**, N 1-2. – P. 29-43.
- Henderson R.J., Leftley J.W., Sargent J.R.* Lipid composition and biosynthesis in the marine dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii* // *Phytochemistry.* – 1988. – **27**, N 6. – P. 1679-1683.
- Henrikson R.* *Earth Food Spirulina.* – Laguna Beach (California): Renore Enterprises, Inc., 1989. – 179 p.
- Hill J., Nelson E., Tilman D., Polasky S., Tiffany D.* Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – **103**, N 30. – P. 11206-11210.
- Horrocks L.A., Yeo Y.K.* Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA) // *Pharmacol. Res.* – 1999. – **40**, N 3. – P. 211-225.
- International Energy Annual*, 2005. <http://www.eia.doe.gov/iea/overview.html>
- Jiang Y., Chen F., Liang S.-Z.* Production potential of docosahexaenoic acid by the heterotrophic marine dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii* // *Process Biochem.* – 1999. – **34**, N 6-7. – P. 633-637.
- Jorgensen B.B.* Space for hydrogen // *Nature.* – 2001. – **482**, N 6844. – P. 286-289.
- Kantarci N., Borak F., Ulgen K.O.* Bubble column reactors // *Process Biochem.* – 2005. – **40**, N 7. – P. 2263-2283.
- Kato T., Hancock R.L., Mohammadpour H., McGregor B., Manalo P., Khaiboullina S., Hall M.R., Pardini L., Pardini R.S.* Influence of omega-3 fatty acids on the growth of human colon carcinoma in nude mice // *Cancer Lett.* – 2002. – **187**, N 1-2. – P. 169-177.
- Kerfin W., Spiller H., Ernst A., Böger P.* Hydrogenases: Their catalytic activity, structure and function / Eds. H. Schlegel, K. Schneider. – Gottingen: Goltze, 1978. – P. 381-387.
- Kerfin W., Böger P.* Light-induced hydrogen evolution by blue-green algae (Cyanobacteria) // *Physiol. Plant.* – 1982. – **54**, N 1. – P. 93-98.

- Khozin-Goldberg I., Bigogno C., Shrestha P., Cohen Z.* Nitrogen starvation induces the accumulation of arachidonic acid in the freshwater green alga *Parietochloris incisa* (Trebuxiophyceae) // J. Phycol. – 2002. – **38**, N 5. – P. 991-994.
- Knothe G.* Analyzing biodiesel: standards and other methods // J. Amer. Oil Chem. Soc. – 2006. – **83**, N 10. – P. 823-833.
- Komárek J., Marvan P.* Morphological differences in natural populations of the genus *Botryococcus* (Chlorophyceae) // Arch. Protist. – 1992. – **141**, N 1-2. – P. 65-100.
- Komárek J., Anagnostidis K.* Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales // Süßwasserflora von Mitteleuropa / Eds. H. Ettl, G. Gärtner, H. Heynig, D. Mollenhauer. – Jena; Stuttgart; Lübeck; Ulm: Gustav Fischer, 1998. – **19/1**. – 548 p.
- Komárek J., Anagnostidis K.* Cyanoprokaryota 2. Teil / 2nd Part: Oscillatoriales // Süßwasserflora von Mitteleuropa / Eds. B. Büdel, L. Krienitz, G. Gärtner, M. Schagerl. – Heidelberg: Elsevier/Spektrum, 2005. – **19/2**. – 759 p.
- Kosourov S., Seibert M., Ghirardi M.L.* Effects of extracellular pH on the metabolic pathways in sulfur-deprived, H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* cultures // Plant Cell Physiol. – 2003. – **44**, N 2. – P. 146-155.
- Krawczyk T.* Biodiesel – alternative fuel makes inroads but hurdles remain // INFORM. – 1996. – **7**, N 8. – P. 801-829.
- Kuhl A.* Inorganic phosphorus uptake and metabolism // Physiology and biochemistry of algae / Ed. R.A. Lewin. – New York: Academic Press, 1962. – P. 211-229.
- Kushak R.I., Drapeau C., Van Cott E.M., Winter H.H.* Favorable effects of blue-green algae *Aphanizomenon flos-aquae* on rat plasma lipids // J. Amer. Nutraceutic. Assoc. – 2000. – **2**, N 3. – P. 59-65.
- Kyle D.J.* Production and use of lipids from microalgae // Lipid Technol. – 1992. – **4**, N 3. – P. 59-64.
- Largeau C., Casadevall E., Berkaloff C., Dhamelin-court P.* Sites of accumulation and composition of hydrocarbons in *Botryococcus braunii* // Phytochemistry. – 1980. – **19**, N 6. – P. 1043-1051.
- Li X., Xu H., Wu Q.* Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors // Biotechnol. Bioeng. – 2007. – **98**, N 4. – P. 764-771.
- Lindberg P., Lindblad P., Cournac L.* Gas exchange in the filamentous cyanobacterium *Nostoc punctiforme* strain ATCC 29133 and its hydrogenase-deficient mutant strain NHM5 // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – **70**, N 4. – P. 2137-2145.

- Lindblad P.* Cyanobacterial H₂ metabolism: knowledge and potential/strategies for a photobiotechnological production of H₂ // *Biotechnol. Aplicada*. – 1999. – **16**, N 3. – P. 141-144.
- Lindblad P., Sellstedt A.* Occurrence and localization of an uptake hydrogenase in the filamentous heterocystous cyanobacterium *Nostoc* PCC 73102 // *Protoplasma*. – 1990. – **159**, N 1. – P. 9-15.
- Long S.P., Zhu X.-G., Naidu S.L., Ort D.R.* Can improvement in photosynthesis increase crop yields? // *Plant Cell Environ.* – 2006. – **29**, N 3. – P. 315-330.
- Loya S., Reshef V., Mizrahi E., Silberstein C., Rachamim Y., Carmeli S., Hizi A.* The inhibition of the reverse transcriptase of HIV-1 by the natural sulfoglycolipids from cyanobacteria: contribution of different moieties to their high potency // *J. Nat. Prod.* – 1998. – **61**, N 7. – P. 891-895.
- Ma F., Hanna M.A.* Biodiesel production: a review // *Bioresource Technol.* – 1999. – **70**, N 1. – P. 1-15.
- Makrides M., Neumann M., Simmer K., Pater J., Gibson R.* Are long-chain polyunsaturated fatty acids essential nutrients in infancy? // *Lancet*. – 1995. – **345**, N 8963. – P. 1463-1468.
- Mansour M.P., Volkman J.K., Holdsworth D.G., Jackson A.E., Blackburn S.I.* Very-long-chain (C₂₈) highly unsaturated fatty acids in marine dinoflagellates // *Phytochemistry*. – 1999a. – **50**, N 4. – P. 541-548.
- Mansour M.P., Volkman J.K., Jackson A.E., Blackburn S.I.* The fatty acid and sterol composition of five marine dinoflagellates // *J. Phycol.* – 1999b. – **35**, N 4. – P. 710-720.
- Mansour M.P., Frampton D.M.F., Nichols P.D., Volkman J.K., Blackburn S.I.* Lipid and fatty acid yield of nine stationary-phase microalgae: Applications and unusual C₂₄-C₂₈ polyunsaturated fatty acids // *J. Appl. Phycol.* – 2005. – **17**, N 4. – P. 287-300.
- Manuel J.* Battle of the biofuels // *Environ. Health Perspect.* – 2007. – **115**, N 2. – P. A92-A95.
- Markov S.A., Weaver P.F., Seibert M.* Spiral tubular bioreactors for hydrogen production by photosynthetic microorganisms. Design and operation // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 1997. – **63-65**. – P. 577-584.
- Masukawa H., Sakurai H.* Genetic engineering of *Anabaena* PCC 7120 toward improvement of photobiological H₂ production and disruption of homocitrate synthase genes: (Annual Meeting and Symposia of the 2003 Annual Meeting (Nara) of the Japanese Society of Plant Physiologist (JSPP), Osaka, March 27-29 2003) // *Plant Cell Physiol. (Suppl.)* – 2003. – **44**. – P. 116.
- McKirdy D.M., Cox R.E., Volkman J.K., Howell V.J.* Botryococcane in a new class of Australian non-marine crude oils // *Nature*. – 1986. – **320**, N 6057. – P. 57-59.

- Medina A.R., Grima E.M., Giménez A.G., González M.J.I.* Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids // *Biotechnol. Adv.* – 1998. – **16**, N 3. – P. 517-580.
- Meher L.C., Vidya Sagar D., Naik S.N.* Technical aspects of biodiesel production by transesterification – a review // *Renew. Sustain. Energy Rev.* – 2006. – **10**, N 3. – P. 248-268.
- Meka P.K., Tripathi V., Singh R.P.* Synthesis of biodiesel fuel from sunflower oil using various reaction parameters // *J. Oleo. Sci.* – 2006. – **56**, N 1. – P. 9-12.
- Melis A., Neidhardt J., Benemann J.R.* *Dunaliella salina* (Chlorophyta) with small chlorophyll antenna sizes exhibit higher photosynthetic productivities and photon use efficiencies than normally pigmented cells // *J. Appl. Phycol.* – 1998. – **10**, N 6. – P. 515-525.
- Metting F.B.* Biodiversity and application of microalgae // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 1996. – **17**, N 5-6. – P. 477-489.
- Metzger P., Allard B., Casadevall E., Berkloff C.* Structure and chemistry of a new chemical race of *Botryococcus braunii* that produces lycopadiene, a tetraterpenoid hydrocarbon // *J. Phycol.* – 1990. – **26**, N 2. – P. 258-266.
- Metzger P., Largeau C.* *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2005. – **66**, N 5. – P. 486-496.
- Micro-algal biotechnology* / Eds. M.A. Borowitzka, L.J. Borowitzka. – Cambridge; New York; New Rochelle; Melbourne; Sydney: Cambridge Univ. Press, 1988. – 488 p.
- Mikheeva L.E., Schmitz O., Shestakov S.V., Bothe H.* Mutants of the cyanobacterium *Anabaena variabilis* altered in hydrogenase activities // *Z. Naturforsch.* – 1995. – **50c**, N 7-8. – P. 505-510.
- Miyashita H., Takejama H., Matsunogu T.* Relationships between molecular phylogeny and hydrogen productivity of hydrogen-producing marine cyanobacteria (45 Annual Meeting of the Japanese Society of Plant Physiologist (JSPP), Tokyo, March 27-29 2004) // *Plant Cell Physiol. (Suppl.)* – 2004. – **45**. – P. 22.
- Moldowan J.M., Seifert W.K.* First discovery of botryococcane in petroleum // *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* – 1980. – **19**. – P. 912-914.
- Monod J.* The growth of bacterial cultures // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1949. – **3**. – P. 371-394.
- Monteith J.L.* Climate and the efficiency of crop production in Britain // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* – 1977. – **281**, N 980. – P. 277-294.
- Morimoto T., Nagatsu A., Murakami N., Sakakibara J., Tokuda H., Nishino H., Iwashima A.* Anti-tumour-promoting glyceroglycolipids from the green alga, *Chlorella vulgaris* // *Phytochemistry.* – 1995. – **40**, N 5. – P. 1433-1437.

- Mortensen S.H., Børsheim K.Y., Rainuzzo J.R., Knutsen G.* Fatty acid and elemental composition of the marine diatom *Chaetoceros gracilis* Schütt. Effects of silicate deprivation, temperature and light intensity // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* – 1988. – **122**, N 2. – P. 173-185.
- Murata N., Wada H., Gombos Z.* Modes of fatty-acid desaturation in cyanobacteria // *Plant Cell Physiol.* – 1992. – **33**, N 7. – P. 933-941.
- Nakahara T., Yokochi T., Higashihara T., Tanaka S., Yaguchi T., Honda D.* Production of docosahexaenoic and docosapentaenoic acids by *Schizochytrium* sp. isolated from Yap islands // *J. Amer. Oil Chem. Soc.* – 1996. – **73**, N 11. – P. 1421-1426.
- Nichols B.W., Appleby R.S.* The distribution and biosynthesis of arachidonic acid in algae // *Phytochemistry.* – 1969. – **8**, N 10. – P. 1907-1915.
- Nishida I., Murata N.* Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: the crucial contribution of membrane lipids // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1996. – **47**. – P. 541-568.
- Okada S., Murakami M., Yamaguchi K.* Hydrocarbon composition of newly isolated strains of the green microalga *Botryococcus braunii* // *J. Appl. Phycol.* – 1995. – **7**, N 6. – P. 555-559.
- Okada S., Devarenne T.P., Murakami M., Abe H., Chappell J.* Characterization of botryococcene synthase enzyme activity, a squalene synthase-like activity from the green microalga *Botryococcus braunii*, race B // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2004. – **422**, N 1. – P. 110-118.
- Painter T.J.* Structural evolution of glycans in algae // *Pure Appl. Chem.* – 1983. – **55**, N 4. – P. 677-694.
- Patil V., Källqvist T., Olsen E., Vogt G., Gislerød H.R.* Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed // *Aquaculture Int.* – 2007. – **15**, N 1. – P. 1-9.
- Peschek G.A.* Aerobic hydrogenase activity in *Anacystis nidulans*. The oxyhydrogen reaction // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1979a. – **548**, N 2. – P. 203-215.
- Peschek G.A.* Evidence for two functionally distinct hydrogenases in *Anacystis nidulans* // *Arch. Microbiol.* – 1979b. – **123**, N 1. – P. 81-92.
- Piveteau F., Gandemer G., Baud J.-P., Demaimay M.* Changes in lipid and fatty acid compositions of European oysters fattened with *Skeletonema costatum* diatom for six weeks in ponds // *Aquaculture Int.* – 1999. – **7**, N 5. – P. 341-355.
- Polle J.E.W., Kanakagiri S., Jin E.S., Masuda T., Melis A.* Truncated chlorophyll antenna size of the photosystems – a practical method to improve microalgal productivity and hydrogen production in mass culture // *Int. J. Hydrogen Energy.* – 2002. – **27**, N 11-12. – P. 1257-1264.
- Rao K.K., Hall D.O.* Hydrogen production by cyanobacteria: potential, problems and prospects // *J. Mar. Biotechnol.* – 1996. – **4**, N 1. – P. 10-15.
- Ratledge C.* Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production // *Biochimie.* – 2004. – **86**, N 11. – P. 807-815.

- Regnault A., Chervin D., Chammai A., Piton F., Calvayrac R., Mazliak P.* Lipid composition of *Euglena gracilis* in relation to carbon-nitrogen balance // *Phytochemistry*. – 1995. – **40**, N 3. – P. 725-733.
- Reitan K.I., Rainuzzo J.R., Olsen Y.* Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae // *J. Phycol.* – 1994. – **30**, N 6. – P. 972-979.
- Renaud S.M., Thinh L.-V., Parry D.L.* The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture // *Aquaculture*. – 1999. – **170**, N 2. – P. 147-159.
- Reshef V., Mizrahi E., Maretzki T., Silberstein C., Loya S., Hizi A., Carmeli S.* New acylated sulfoglycolipids and digalactolipids and related known glycolipids from cyanobacteria with a potential to inhibit the reverse transcriptase of HIV-1 // *J. Nat. Prod.* – 1997. – **60**, N 12. – P. 1251-1260.
- Rězanka T., Vokoun J., Slaviček J., Podojil M.* Determination of fatty acids in algae by capillary gas chromatography-mass spectrometry // *J. Chromatogr. A*. – 1983. – **268**. – P. 71-78.
- Rho M.-C., Matsunaga K., Yasuda K., Ohizumi Y.* A novel monogalactosylacylglycerol with inhibitory effect on platelet aggregation from the cyanophyceae *Oscillatoria rosea* // *J. Nat. Prod.* – 1996. – **59**, N 3. – P. 308-309.
- Richmond A.* Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: A personal view // *J. Appl. Phycol.* – 2000. – **12**, N 3-5. – P. 441-451.
- Rippka R., Deruelles J., Waterbury J.B., Herdman M., Stanier R.Y.* Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria // *J. Gen. Microbiol.* – 1979. – **111**, N 1 – P. 1-61.
- Robertson G.P., Paul E.A., Harwood R.R.* Greenhouse gases in intensive agriculture: contributions of individual gases to the radiative forcing of the atmosphere // *Science*. – 2000. – **289**, N 5486. – P. 1922-1925.
- Roessler P.* Environmental control on glycerolipid metabolism in microalgae: commercial implications and future research directions // *J. Phycol.* – 1990. – **26**, N 3. – P. 393-399.
- Sawayama S., Inoue S., Yokoyama S.* Continuous culture of hydrocarbon-rich microalga *Botryococcus braunii* in secondarily treated sewage // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1994. – **41**, N 6. – P. 729-731.
- Sawayama S., Minowa T., Yokoyama S.-Y.* Possibility of renewable energy production and CO₂ mitigation by thermochemical liquefaction of microalgae // *Biomass Bioenergy*. – 1999. – **17**, N 1. – P. 33-39.
- Schäfer K.* Accelerated solvent extraction of lipids for determining the fatty acid composition of biological material // *Anal. Chim. Acta*. – 1998. – **358**, N 1. – P. 69-77.

- Schmidt C.W.* Biodiesel: Cultivating alternative fuels // *Environ. Health Perspect.* – 2007. – **115**, N 2. – P. A86-A91.
- Senousy H.H., Beakes G.W., Hack E.* Phylogenetic placement of *Botryococcus braunii* (Trebouxiophyceae) and *Botryococcus sudeticus* isolate UTEX 2629 (Chlorophyceae) // *J. Phycol.* – 2004. – **40**, N 2. – P. 412-423.
- Servel M.-O., Claire C., Derrien A., Coiffard L., De Roeck-Holtzhauer Y.* Fatty acid composition of some marine microalgae // *Phytochemistry.* – 1994. – **36**, N 3. – P. 691-693.
- Shahidi F., Wanasundara U.N.* Omega-3 fatty acid concentrates: nutritional aspects and production technologies // *Trends Food Sci. Technol.* – 1998. – **9**, N 6. – P. 230-240.
- Shay E.G.* Diesel fuel from vegetable oils: status and opportunities // *Biomass Bioenergy.* – 1993. – **4**, N 4. – P. 227-242.
- Shifrin N.S., Chisholm S.W.* Phytoplankton lipids: Interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles // *J. Phycol.* – 1981. – **17**, N 3. – P. 374-384.
- Shirahashi H., Murakami N., Watanabe M., Nagatsu A., Sakakibara J., Tokuda H., Nishino H., Iwashima A.* Isolation and identification of anti-tumor-promoting principles from the freshwater cyanobacterium *Phormidium tenue* // *Chem. Pharm. Bull.* – 1993. – **41**, N 9. – P. 1664-1666.
- Shirahashi H., Morimoto T., Nagatsu A., Murakami N., Tatta K., Sakakibara J., Tokuda H., Nishino H.* Antitumor-promoting activities of various synthetic 1-*O*-acyl-3-*O*-(6'-*O*-acyl-beta-D-galactopyranosyl)-*sn*-glycerols related to natural product from freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* f. *flos-aquae* // *Ibid.* – 1996. – **44**, N 7. – P. 1404-1406.
- Simopoulos A.P.* Essential fatty acids in health and chronic disease // *Amer. J. Clin. Nutr.* – 1999. – **70**, N 3. – P. 560S-569S.
- Simopoulos A.P.* The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids // *Biomed. Pharmacother.* – 2002. – **56**, N 8. – P. 365-379.
- Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A.* Commercial applications of microalgae // *J. Biosci. Bioeng.* – 2006. – **101**, N 2. – P. 87-96.
- Stencel C.* Green algae could someday yield green energy // *ASM News.* – 2000. – **66**, N 7. – P. 389-390.
- Suen Y., Hubbard J.S., Holzer G., Tornabene T.G.* Total lipid production of the green alga *Nannochloropsis* sp. QII under different nitrogen regimes // *J. Phycol.* – 1987. – **23**, N s2. – P. 289-296.
- Tamagnini P., Axelsson R., Lindberg P., Oxelfelt F., Wünschiers R., Lindblad P.* Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2002. – **66**, N 1. – P. 1-20.

- Tatsuzawa H., Takizawa E.* Changes in lipid and fatty acid composition of *Pavlova lutheri* // *Phytochemistry*. – 1995. – **40**, N 2. – P. 397-400.
- Tedesco M.A., Duerr E.O.* Light, temperature and nitrogen starvation effects on the total lipid and fatty acid content and composition of *Spirulina platensis* UTEX 1928 // *J. Appl. Phycol.* – 1989. – **1**, N 3. – P. 201-209.
- Thompson P.A., Harrison P.J., Whyte J.N.C.* Influence of irradiance on the fatty acid composition of phytoplankton // *J. Phycol.* – 1990. – **26**, N 2. – P. 278-288.
- Tokuda H., Nishino H., Shirahashi H., Murakami N., Nagatsu A., Sakakibara J.* Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate promoted mouse skin papilloma by digalactosyl diacylglycerols from the fresh water cyanobacterium *Phormidium tenue* // *Cancer Lett.* – 1996. – **104**, N 1. – P. 91-95.
- Tornabene T.G., Holzer G., Lien S., Burris N.* Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans* // *Enzyme Microb. Technol.* – 1983. – **5**, N 6. – P. 435-440.
- Tsuzuki M., Ohnuma E., Sato N., Takaku T., Kawaguchi A.* Effects of CO₂ concentration during growth on fatty acid composition in microalgae // *Plant Physiol.* – 1990. – **93**, N 3. – P. 851-856.
- Tsygankov A.A., Serebryakova L.T., Rao K.K., Hall D.O.* Acetylene reduction and hydrogen photoproduction by wild-type and mutant strains of *Anabaena* at different CO₂ and O₂ concentrations // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1998. – **167**, N 1. – P. 13-17.
- Van Gerpen J.* Biodiesel processing and production // *Fuel Process. Technol.* – 2005. – **86**, N 10. – P. 1097-1107.
- Van Gerpen J., Shanks B., Pruszko R., Clements D., Knothe G.* Biodiesel Production Technology // Report from Iowa State University for the National Renewable Energy Laboratory, NREL/SR-510-36244, July 2004.
- Viron C., Saunio A., André P., Perly B., Lafosse M.* Isolation and identification of unsaturated fatty acid methyl esters from marine micro-algae // *Anal. Chim. Acta.* – 2000. – **409**, N 1-2. – P. 257-266.
- Viso A.-C., Marty J.-C.* Fatty acids from 28 marine microalgae // *Phytochemistry*. – 1993. – **34**, N 6. – P. 1521-1533.
- Wada H., Murata N.* Membrane lipids in cyanobacteria // *Lipids in photosynthesis: structure, function and genetics* / Eds. P.-A. Siegenthaler, N. Murata. – Dordrecht; Boston; London: Kluwer Acad. Publ., 1998. – P. 65-81.
- Ward O.P., Singh A.* Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production // *Process Biochem.* – 2005. – **40**, N 12. – P. 3627-3652.

- Wolf F.R., Nonomura A.M., Bassham J.A.* Growth and branched hydrocarbon production in a strain of *Botryococcus braunii* (Chlorophyta) // J. Phycol. – 1985. – **21**, N 3. – P. 388-396.
- Xiong W., Li X., Xiang J., Wu Q.* High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – **78**, N 1. – P. 29-36.
- Yang S., Wang J., Cong W., Cai Z., Ouyang F.* Effects of bisulfite and sulfite on the microalga *Botryococcus braunii* // Enzyme Microb. Technol. – 2004a. – **35**, N 1. – P. 46-50.
- Yang S., Wang J., Cong W., Cai Z., Ouyang F.* Utilization of nitrite as a nitrogen source by *Botryococcus braunii* // Biotechnol. Lett. – 2004b. – **26**, N 3. – P. 239-243.
- Yongmanitchai W., Ward O.P.* Omega-3 fatty acids: alternative sources of production // Process Biochem. – 1989. – **24**, N 4. – P. 117-125.
- Zarrouk C.* Contribution à l'étude d'une cyanophycée influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima* (Setch. et Gardner) Geitler // In: Theses présentées à la faculté des sciences de l'université de Paris. – 1966. – 85 p.
- Zehnder A., Gorham P.R.* Factors influencing the growth of *Microcystis aeruginosa* Kütz. emend. Elenkin // Can. J. Microbiol. – 1960. – **6**, N 6. – P. 645-660.
- Zhu X.-G., Long S.P., Ort D.R.* What is the maximum efficiency with which photosynthesis can convert solar energy into biomass? // Curr. Opin. Biotechnol. – 2008. – **19**, N 2. – P. 153-159.
- Zhukova N.V., Aizdaicher N.A.* Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae // Phytochemistry. – 1995. – **39**, N 2. – P. 351-356.

АНОТАЦІЯ

Книга присвячена одній з актуальних проблем біотехнології – використанню фотоавтотрофних організмів, зокрема синьозелених і зелених мікроводоростей, здатних запасати сонячну енергію за рахунок фотосинтезу, для створення нових нетрадиційних джерел енергії. Автори, співробітники відділу мембранології і фітохімії Інституту ботаніки Національної академії наук України, на підставі аналізу біохімічних властивостей мікроводоростей окреслили перспективи їх використання як джерела енергії і корисних речовин та можливих шляхів застосування в біоенергетиці та біотехнології.

Використання фотосинтезу як ефективного та екологічно безпечного природного механізму трансформації сонячної енергії для створення сучасної альтернативної енергетики особливо актуальне в зв'язку з кризою традиційної невідновлюваної енергетичної бази, яка заснована на використанні викопних палив.

У роботі коротко наведені біологічні характеристики мікроводоростей, які служать об'єктами біотехнологічних досліджень, відомості про специфіку їх розвитку, умови та принципи культивування та зберігання. Розглянуті конструкції дослідницьких та промислових фотореакторів, які використовуються для їх вирощування. Наведені дані щодо здатності мікроводоростей продукувати за рахунок фотосинтетичного перетворення енергії молекулярний водень – високоенергетичний і екологічно чистий вид пального. Наведені основні характеристики мікроводорості *Botryococcus braunii*, яка завдяки своїм біологічним властивостям є перспективним потенціальним продуцентом екологічно чистого і поновлюваного джерела енергії – рідких вуглеводнів. Представлені дані стосовно накопичення ліпідів і жирних кислот у значній кількості мікроводоростей і в зв'язку з цим розглянута перспектива їх використання як сировини для виробництва біодизельного палива, привабливого для цілого ряду галузей промисловості і транспорту. Коротко окреслені етапи технології виробництва біодизельного пального, технологічні вимоги до якості продукту, відомості про потенціал промислового виробництва біодизелю у світі.

Дана монографія призначена для широкого кола читачів, які бажають познайомитися з біологічними особливостями мікроводоростей і отримати необхідні первинні знання з їх культивування та переробки.

РЕЗЮМЕ

Книга посвящена одной из актуальных проблем биотехнологии – использованию фотоавтотрофных организмов, в частности, способных к запасанию солнечной энергии синезелёных и зелёных микроводорослей, для создания новых нетрадиционных источников энергии. Авторы, сотрудники отдела мембранологии и фитохимии Института ботаники Национальной академии наук Украины, на основании анализа биохимических свойств микроводорослей очертили перспективы их применения в качестве источника энергии и полезных соединений, а также возможные пути их использования в биоэнергетике и биотехнологии.

Использование фотосинтеза как эффективного и экологически безопасного природного механизма трансформации солнечной энергии для создания современной альтернативной энергетики особенно актуально в связи с кризисом традиционной невозобновимой энергетической базы, основанной на потреблении ископаемых горючих веществ.

В работе приведены краткие биологические характеристики микроводорослей, являющихся объектами биотехнологических исследований, сведения о специфике их развития, условиях и принципах культивирования и хранения. Рассматриваются конструкции исследовательских и промышленных фотореакторов, используемых для их выращивания. Приведены данные о способности микроводорослей продуцировать за счёт фотосинтетического преобразования энергии молекулярный водород – высокоэнергетический и экологически чистый вид топлива. Даны основные характеристики микроводоросли *Botryococcus braunii*, которая, благодаря своим биологическим свойствам, является перспективным потенциальным продуцентом экологически чистого и возобновимого источника энергии – жидких углеводородов. Представлены данные о накоплении липидов и жирных кислот у значительного количества микроводорослей, и в связи с этим рассмотрена перспектива их использования в качестве сырья для производства биодизельного топлива, представляющего интерес для целого ряда отраслей промышленности и транспорта. Кратко очерчены этапы технологии производства биодизельного топлива, технологические требования к качеству продукта, сведения о потенциале промышленного производства биодизеля в мире.

Настоящая монография предназначена для широкого круга читателей, желающих ознакомиться с биологическими особенностями микроводорослей и получить необходимые первичные сведения об их культивировании и переработке.

SUMMARY

The book covers the urgent biotechnological problem – the use of photoautotrophic organisms capable of reserving of solar energy at the expense of photosynthesis, particularly blue-green algae (cyanobacteria) and green microalgae, in the creation of new unconventional power sources. Basing on the analysis of biochemical properties of microalgae, the authors, researchers of Membranology and Phytochemistry Department of the Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, outlined the prospects of the utilization of microalgae as the source of energy and valuable substances and the possible ways of their employment in bioenergetics and biotechnology.

The use of photosynthesis as the effective and environmentally safe natural mechanism for the transformation of solar energy is particularly urgent in the formation of modern alternative energetics because of the crisis in the traditional nonrenewable power supplies based on the utilization of fossil fuels.

The work briefly describes the characteristics of microalgae that are the targets of biotechnological study, represents the specificity of their development, the conditions and principles of cultivation and storage. The constructions of research and industrial photoreactors used for the cultivation of microalgae are considered. The data concerning the ability of microalgae to produce molecular hydrogen, high-energy and environmentally safe kind of fuel, at the expense of photosynthetic energy transformation, are presented. Main characteristics of *Botryococcus braunii*, the microalga that, owing to its biological properties, is the promising potential producer of ecologically clean and renewable energy source, liquid hydrocarbons, are described. The information about the accumulation of lipids and fatty acids in plenty of microalgae is given, and in this connection the perspective of their utilization as raw material for the production of biodiesel, the fuel attractive for quite a number of branches of industry and transport, is regarded. The stages of biodiesel fuel production process, quality specifications of the product and the data on the potential of the industrial biodiesel production in the world are briefly outlined.

The present monograph is assigned for the wide range of readers wishing to acquaint themselves with the biological peculiarities of microalgae and to get essential basic knowledge about their cultivation and processing.

Перспективи використання мікроводоростей у біотехнології / О.К. Золотарьова, Є.І. Шнюкова, О.О. Сиваш, Н.Ф. Михайленко; Під ред. О.К. Золотарьової. – К.: Альтерпрес, 2008. – 234 с.

ISBN 966-542-389-4

Монографія присвячена використанню фототрофних мікроводоростей як нових нетрадиційних джерел енергії. Наведені біологічні характеристики мікроводоростей – об'єктів біотехнологічних досліджень, відомості про специфіку їх розвитку, умови та принципи культивування та зберігання. Розглянуто конструкції дослідницьких та промислових фотореакторів. Представлено дані щодо здатності мікроводоростей до продукування на світлі молекулярного водню. Охарактеризовано водорість *Botryococcus braunii* – продуцент рідких вуглеводнів. Наведено відомості стосовно накопичення ліпідів і жирних кислот мікроводоростями, розглянуто перспективи їх використання як сировини для виробництва біодизельного палива.

Книга призначена для широкого кола читачів, які бажають познайомитися з біологічними особливостями мікроводоростей і отримати необхідні первинні знання з їх культивування та переробки.

Перспективы использования микроводорослей в биотехнологии / Е.К. Золотарёва, Е.И. Шнюкова, А.А. Сиваш, Н.Ф. Михайленко; Под ред. Е.К. Золотарёвой. – К.: Альтерпрес, 2008. – 234 с.

ISBN 966-542-389-4

Монография посвящена использованию фототрофных микроводорослей в качестве новых нетрадиционных источников энергии. Приведены биологические характеристики микроводорослей – объектов биотехнологических исследований, сведения о специфике их развития, условиях и принципах культивирования и хранения. Рассматриваются конструкции исследовательских и промышленных фотореакторов. Приведены данные о способности микроводорослей продуцировать на свету молекулярный водород. Охарактеризована водоросль *Botryococcus braunii* – продуцент жидких углеводородов. Представлены сведения о накоплении липидов и жирных кислот микроводорослями, рассмотрены перспективы их использования в качестве сырья для производства биодизельного топлива.

Книга предназначена для широкого круга читателей, желающих ознакомиться с биологическими особенностями микроводорослей и получить необходимые первичные сведения об их культивировании и переработке.