

***Monoraphidium* sp. IBASU-A 574 (*Selenastraceae*, *Chlorophyta*) – перспективний продуцент біомаси для біоенергетики**

Царенко П.М.¹, Борисова О.В.¹, Хархота М.А.², Зелена Л.Б.², Коніщук М.О.¹, Бурова О.В.¹, Блюм Я.Б.³

¹ Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України,
вул. Терещенківська, 2, Київ 01601, Україна
ptsar@ukr.net

² Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ 03680, Україна

³ Держустанова «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,
вул. Осиповського, 2а, Київ 04123, Україна

Надійшла до редакції 16.01.2022. Після доопрацювання 21.02. 2022. Підписана до друку 23.02.2022.

Опублікована 22.03.2022

Реферат. Представлено результати дослідження нового регіонального штаму зеленої водорості *Monoraphidium* sp. IBASU-A 574 (*Selenastraceae*, *Chlorophyceae*) з метою оцінки його біотехнологічного потенціалу для виробництва біодизеля. Штам, адаптований до кліматичних умов помірної зони, ізолювано з прісноводної водойми на території м. Києва у 2014 р. з використанням методу накопичувальних культур на селективних живильних середовищах, що дозволяє отримувати штами швидкорозростаючих водоростей різних видів. Ідентифікація проведена з урахуванням морфологічних ознак методом світлової мікроскопії та молекулярно-філогенетичного аналізу за ділянкою нуклеотидної послідовності гена 18S рРНК. Дослідження характеру росту, кінетичних характеристик (питомої швидкості росту і продуктивності) та біологічних особливостей ізолюваного штаму проведено за однакових умов автотрофного культивування на середовищі Тамія. Контрольним варіантом слугував відомий продуцент біомаси *Chlorella vulgaris* Beijer. CALU 157. Встановлено активний ріст *Monoraphidium* sp. 574, який практично дорівнює контрольному і характеризується такими параметрами: максимальна кількість клітин – 248 млн·мл⁻¹, питома швидкість росту 1,4 доби⁻¹, продуктивність 72,5 млн кл.·мл⁻¹·доби⁻¹. За результатами аналізу жирнокислотного складу ліпідів досліджуваного штаму методом газорідинної хроматографії виявлено наявність провідного комплексу з пальмітинової (C16:0), олеїнової (C18:1), лінолевої

© Царенко П.М., Борисова О.В., Хархота М.А., Зелена Л.Б., Коніщук М.О.,
Бурова О.В., Блюм Я.Б., 2022

(C18:2) та ліноленої (C18:3) жирних кислот, кількісне співвідношення яких обумовлює якість сировини для виробництва біопалива. В експериментах відзначено динаміку формування жирнокислотного профілю ліпідів в залежності від стадії росту культури, що підтверджує необхідність проведення таких досліджень для визначення оптимального терміну вирощування водоростей і забезпечення найбільшого виходу цільового продукту. На основі отриманих даних *Monoraphidium* sp. IBASU-A 574 визначено як перспективний продуцент біомаси для потреб біоенергетики.

К л ю ч о в і с л о в а : мікрководорості, *Monoraphidium* sp., штам, колекція IBASU-A, ліпіди, жирнокислотний склад, біодизель

Вступ

Мікрководорості – визнана складова біологічних ресурсів. Вони є об'єктами різних галузей господарства і технологічних підходів біоенергоконверсії. На сучасному етапі біотехнологічних досліджень доцільність їхнього використання як ресурсної сировини з метою одержання біодизеля переконливо доведена у численних працях фахівців різних країн (Chisti, 2007; Mata et al., 2007; Zolotaryova et al., 2008; Amin, 2009; Deng et al., 2009; Brennan, Owende, 2010; Sorochinsky et al., 2010; Bohnenberger, Crossetti, 2014; Chandhary et al., 2014; Massimi, Kirkwood 2016; Getachew et al., 2020 та ін.). Однак відносно висока собівартість біопалива з мікрководоростей є значною перешкодою на шляху його активного використання. За цих обставин пошук, введення в культуру, встановлення ростових характеристик, дослідження біохімічного складу біомаси високопродуктивних штамів різних видів водоростей та розробка заходів покращення виходу кінцевого продукту залишається актуальним.

Лідерами наукових розробок, пов'язаних з використанням мікрководоростей у виробництві біоенергосировини є США, Китай та країни ЄС. Починаючи з 1980-х років зусилля вчених спрямовані на вивчення можливостей отримання за допомогою водоростей моторних видів палива та інших енергоємних сполук. У межах Програми з вивчення водних видів (Aquatic Species Program), започаткованої Департаментом енергетики США, проаналізовано понад 3000 штамів різних видів водоростей, ізольованих переважно в південних штатах, і відібрано близько 300 штамів водоростей-продуцентів ліпідів (Sheehan et al., 1998). Виявлено вплив на вміст ліпідів умов культивування і складу поживного середовища, зокрема концентрації азоту, заліза, хлористого натрію. Показано необхідність вивчення кінетики накопичення ліпідів у біомасі водоростей, аналіз їхнього складу, оптимізації продуктивності штамів та певних заходів для збору в найбільш оптимальні терміни, коли утворення ліпідів є максимальним. Незважаючи на це, виробництво енергопродукту з мікрководоростей за показниками енергетичного балансу поки є високовартісним і не може конкурувати з виробництвом рідких видів

палива за рахунок використання традиційних сировинних джерел. Проте численні монографії, статті, патенти останніх років, присвячені використанню мікроводоростей для виробництва біоенергетичних складових, свідчать про необхідність і перспективність продовження досліджень у цьому напрямку (Spolaore et al., 2006; Woertz et al., 2009; Yang et al., 2012; Yu et al., 2012; Holbrook et al., 2014; Patidar et al., 2014; Diaz et al., 2015; Zhu, 2015; Lari et al., 2016; Řezanka, 2017; Sehgal et al., 2019 та ін.).

Першочерговими завданнями для ефективного отримання біоенергосировини залишається пошук вітчизняних конкурентоздатних штамів та вирішення проблем, пов'язаних з підвищенням ефективності їхнього ліпідного накопичення.

В Україні базою досліджень щодо використання водоростей у біотехнології і біоенергетиці є колекція мікроводоростей Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (IBASU-A), яка має статус об'єкта Національного надбання України і містить понад 500 штамів (Borysova, Tsarenko, 2004; Borysova et al., 2016). Серед них на підставі скринінгу, проведеного за такими критеріями, як висока активність росту, здатність до накопичення значної кількості ліпідів та стійкість до стресових чинників і біологічних контамінантів, визначено 33 штами видів-гіперпродуцентів біомаси, перспективних для біоенергетики (Tsarenko et al., 2011, 2016). Однак лише 25% з них є регіональними та адаптованими до кліматичних умов помірної зони. Саме тому метою нашої роботи було дослідження активності росту та біологічних особливостей нового штаму *Monoraphidium* sp. IBASU-A 574, ізольованого з території України, для оцінки його біотехнологічного потенціалу.

Матеріали та методи

Для досліджень використовували альгологічно чисту культуру *Monoraphidium* sp. (штам IBASU-A 574). Водорості вирощували в конічних колбах об'ємом 1000 мл на мінеральних живильних середовищах Тамія (модифіковане) та Бурреллі (Borysova et al., 2014) з об'ємом середовища 200 мл. Товщину шару суспензії постійно підтримували на рівні 3 см. Вихідна кількість посівного матеріалу становила $5 \cdot 10^6$ кл. · мл⁻¹. Культивування вели за умов цілодобового освітлення $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, температури 28–30 °C та барботування. Посівним матеріалом були водорості, які вирощували протягом 10–12 діб на агаризованому середовищі Тамія. Інтенсивність росту водоростей оцінювали шляхом щодобового підрахунку кількості клітин у камері Горяєва або ваговим методом (Methods..., 1975). На підставі одержаних даних розраховували питому швидкість росту (μ) та продуктивність (P) (Trenkinschu, 2005). Ці результати порівнювали з відомим гіперпродуцентом біомаси *Chlorella*

vulgaris Beijer. IBASU-A 189 (= CALU 157). Контроль наявності грибної контамінації проводили на початку та наприкінці культивування водоростей шляхом висіву водоростевої суспензії на середовище ФДГА з додаванням глюкози та дріжджового автолізу (Kvitko et al., 1983).

Склад живильних середовищ: Бурреллі (мг/л): KNO_3 – 200,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 30,0; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – 30,0; K_2HPO_4 – 40,0; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 3,3; ЕДТА (трилон Б) – 5,3; Тамія (модифіковане) (мг/л): KNO_3 – 500,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 100,0; KH_2PO_4 – 100,0; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 10,0; ЕДТА (трилон Б) – 16,0 для *Chlorella vulgaris* 189 та $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 3,3; ЕДТА (трилон Б) – 5,3 для *Monoraphidium* sp. 574. У середовища додавали 15 мл розчину мікроелементів. Склад розчину мікроелементів (мг/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; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,15; NH_4VO_3 – 2,3; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,01.

Кількісний та якісний склад ліпідів у біомасі *Monoraphidium* sp. шт. 754 визначали після 10, 20 та 30 діб вирощування в умовах накопичувальної культури. Біомасу відокремлювали від середовища та промивали дистильованою водою шляхом центрифугування протягом 20 хв при 3000 об·хв⁻¹. Аналіз метилових ефірів жирних кислот здійснювали методом газорідинної хроматографії на газовому хроматографі GS 16A Shimadzu (Японія) з можливістю програмування температури до 330 °C, використовуючи полум'яно-іонізаційний детектор та програмне забезпечення “GS solution”. Для розділення використовували капілярну колонку THERMO TR-FAME (30 mm × 0,25 mm ID × 0,25 mm film) з температурним градієнтом від 70 до 230 °C. Нерухлива фаза – 70% Суанопропіл (equil) Polysiphenylene-siloxane, рухлива – гелій зі швидкістю потоку газу 1 мл · хв⁻¹. Температура інжектора та детектора становила 280 і 260 °C відповідно. Ідентифікацію жирних кислот проводили шляхом порівняння часу утримання компонентів суміші з часом утримання стандартних жирних кислот. Вміст жирних кислот подано у відсотках загальної суми. Отримані результати опрацьовані статистично з використанням стандартного пакета Microsoft Office 2013.

Для молекулярно-генетичного дослідження *Monoraphidium* sp. шт. 754 ДНК виділяли за допомогою набору GeneJet Genomic DNA Purification Kit (ThermoScientific) з використання інструкцій його виробника. Ампліфікацію гена 18S рРНК проводили з праймерами NS1 (5 – GTA GTC ATA TGG TTG TCT C – 3) NS2 (5 – GGC TGG TGG CAC CAG ACT TGC – 3) (White et al., 1990). ПЛІР проводили на ампліфікаторі Mastercycler Personal 5332 (Eppendorff, Німеччина). Очищений ПЛІР-продукт секвенували на приладі Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems, США) з використанням набору BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit. Отриману нуклеотидну послідовність порівнювали з внесеними до бази даних GenBank за допомогою програми NCBI Blastn (<http://>

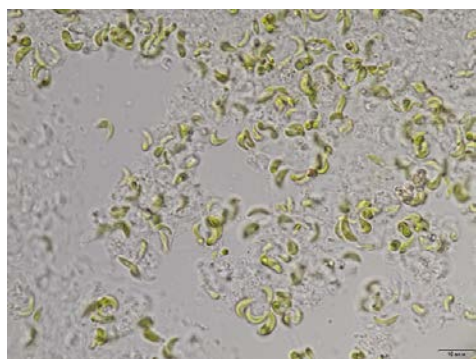
www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Філогенетичний аналіз, вирівнювання нуклеотидних послідовностей гена 18S *r*РНК здійснювали за допомогою програми MEGA 6 (Tamura et al., 2013). Дендрограму філогенетичних зв'язків будували методом максимальної вірогідності (Maximum Likelihood) з використанням 2-параметричної моделі Кімури по 1000 реплікам бутстреп-аналізу. Послідовності гена 18S *r*РНК представників різних видів мікроводоростей використані з бази даних GenBank.

Результати та обговорення

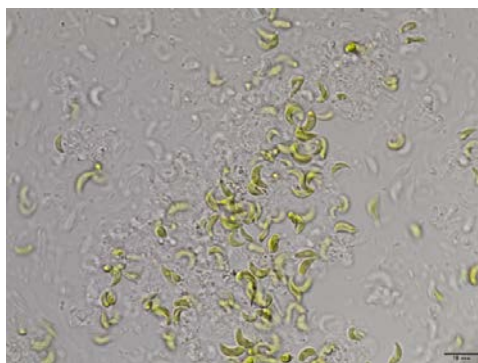
Штам *Monoraphidium* sp. 574 ізолювано з озера Бабине на території м. Києва (50.414 пн. ш., 30.5456 сх. д.) у 2014 р. за допомогою методу накопичувальних культур (Algal..., 2005). Вихідним матеріалом слугувала альгопроба (вижимки з водних судинних рослин) Г.Г. Ліліцької. Водночас з нагромаджувальної культури на основі селективного середовища Бурреллі, де за місяць інкубації на освітлюваній установці домінували водорості роду *Monoraphidium* Komárk.-Legn., ізолювано також низку інших видів зелених кокоїдних водоростей, а саме: *Desmodesmus armatus* (Chodat) E.Hegew., *Messastrum gracile* (Reinsch) T.S.Garcia, *Pectinodesmus pectinatus* (Meyen) E.Hegew. et al., *Scenedesmus obtusus* Meyen, *Tetradesmus acuminatus* (Lagerh.) M.J.Wynne та *T. dimorphus* (Turpin) M.J.Wynne (Borysova et al., 2014). Надалі в процесі їхнього культивування проявились деякі штамові відмінності. Представники родини *Scenedesmaceae* (*Desmodesmus* (Chodat) An et al., *Pectinodesmus* (Meyen) E.Hegew. et al., *Scenedesmus* Meyen та *Tetradesmus* G.M.Smith візуально краще зростали на середовищі Бурреллі, а представники родини *Selenastraceae* – на інших середовищах: *M. gracile* – на середовищі 3N BBM (Bischoff, Bold, 1963), *Monoraphidium* sp. – на середовищі Тамія.

Біологічну характеристику дослідженого штаму *Monoraphidium* sp. 574, адаптованого до кліматичних умов помірної зони, надаємо нижче.

Морфологічні ознаки. Клітини зігнуті, місяцеподібні, біля кінців ледь звужені, спіралеподібно скручені (переважно на півоберту), на полюсах заокруглені (рис. 1). Кінці клітин однакові. Хлоропласт пристінний, вистилає увесь периметр клітини, без піреноїда. Розмножується 4 автоспорами, які вивільняються після розриву материнської оболонки. Розмір клітин: (8)–10–18 мкм завд. та 1,6–3,2 мкм завш., діаметр завитка 4–6,4–(7,2) мкм.



а



б

Рис. 1. Загальний вигляд клітин дослідженого штаму в культурі

Фізіолого-біохімічні особливості. Мезофіл, здатний до міксотрофного росту. У якості джерела азотного живлення використовує амоній, нітрати, сечовину. Зростає в широкому діапазоні рН (від 5 до 9, оптимальний ріст при рН 6,5–0,8), освітленості ($50\text{--}100\ \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), температури (24–32 °С, оптимальний ріст при 28–30 °С). Антибактеріальна активність не виявлена. В альгологічно чистій культурі досліджуваного штаму виявлено 6 видів бактеріальних консортів, які відрізняються за морфологічними, фізіологічними та біохімічними ознаками. Грибна контамінація не виявлена.

Застосування методів традиційної морфології виявилось недостатнім для чіткої ідентифікації та встановлення видового статусу *Monoraphidium* sp. шт. 574. За результатами світлової мікроскопії, вірогідно, він відноситься до групи таксонів з невизначеним родовим статусом, що проявляють ознаки двох або кількох споріднених таксонів. Отримані нами дані молекулярно-генетичного дослідження (рис. 2), лише підтвердили приналежність цього штаму до родини *Selenastraceae*, однак виявилися недостатніми для уточнення його таксономічного статусу, що потребує подальшого вивчення.

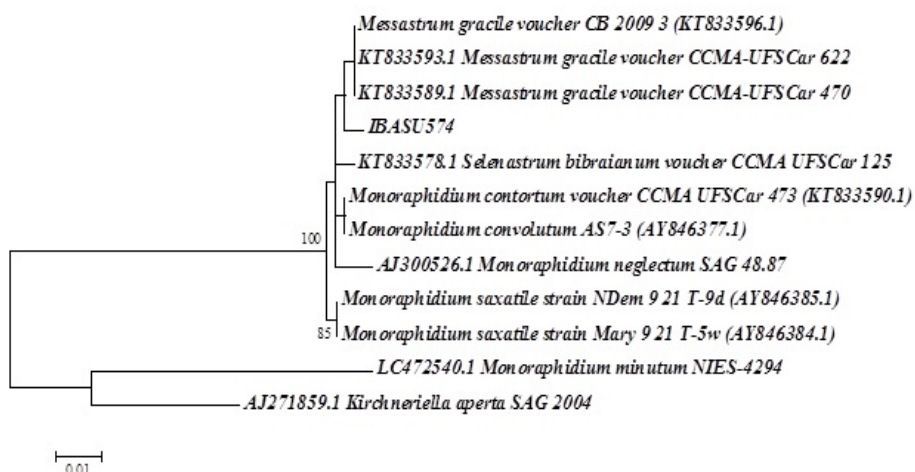


Рис. 2. Кладограма ділянки філогенетичного дерева таксонів родини *Selenastraceae* та місця дослідженого штаму на ньому

Для оцінки біотехнологічного потенціалу вітчизняного штаму *Monoraphidium* sp. шт. 574 проводили дослідження інтенсивності його росту, визначення кінетичних характеристик (питомої швидкості росту та продуктивності), загального вмісту ліпідів біомаси водоростей, кількісного та якісного складу головних жирних кислот. Дослідження інтенсивності росту штаму на середовищах Бурреллі та Тамія проведено за однотипних умов вирощування в інтенсивному режимі (оптимальний pH, температура, освітленість, наявність барботування тощо) порівняно із загальновідомим високопродуктивним штамом *Chlorella vulgaris* IBASU-A 189 (= CALU 157) (порівн.: Tsarenko et al., 2017). Як видно з рис. 3, параметри росту досліджуваного штаму на середовищі Бурреллі (оптимальне для його ізолювання) були досить низькими. Максимальна кількість клітин (В) не перевищувала 28–32 млн кл. · мл⁻¹, питома швидкість росту (μ) становила 0,34 доби⁻¹, продуктивність (Р) – 6,9–7,8 млн кл. · мл⁻¹·доби⁻¹. Проте використання середовища Тамія, яке містить вдвічі більше азоту, призвело до різкого збільшення інтенсивності росту *Monoraphidium* sp. 574 (В – 248 млн кл. · мл⁻¹, μ – 1,4 доби⁻¹, Р – 72,5 млн кл. · мл⁻¹·доби⁻¹), що свідчить про його високий ростовий потенціал. При цьому ростові характеристики виявилися дещо вищими, ніж у відомого гіперпродуцента біомаси *C. vulgaris* 189 (В – 220 млн кл. · мл⁻¹, μ – 0,9 доби⁻¹, Р – 65 млн кл. · мл⁻¹·доби⁻¹). Необхідно відзначити високу питому швидкість росту (μ) вітчизняного штаму, яка на середовищі Тамія становила 1,4 доби⁻¹, що вважається характерною рисою для найактивніших штамів перспективних видів-гіперпродуцентів біомаси (Massimi, Kirkwood, 2016).

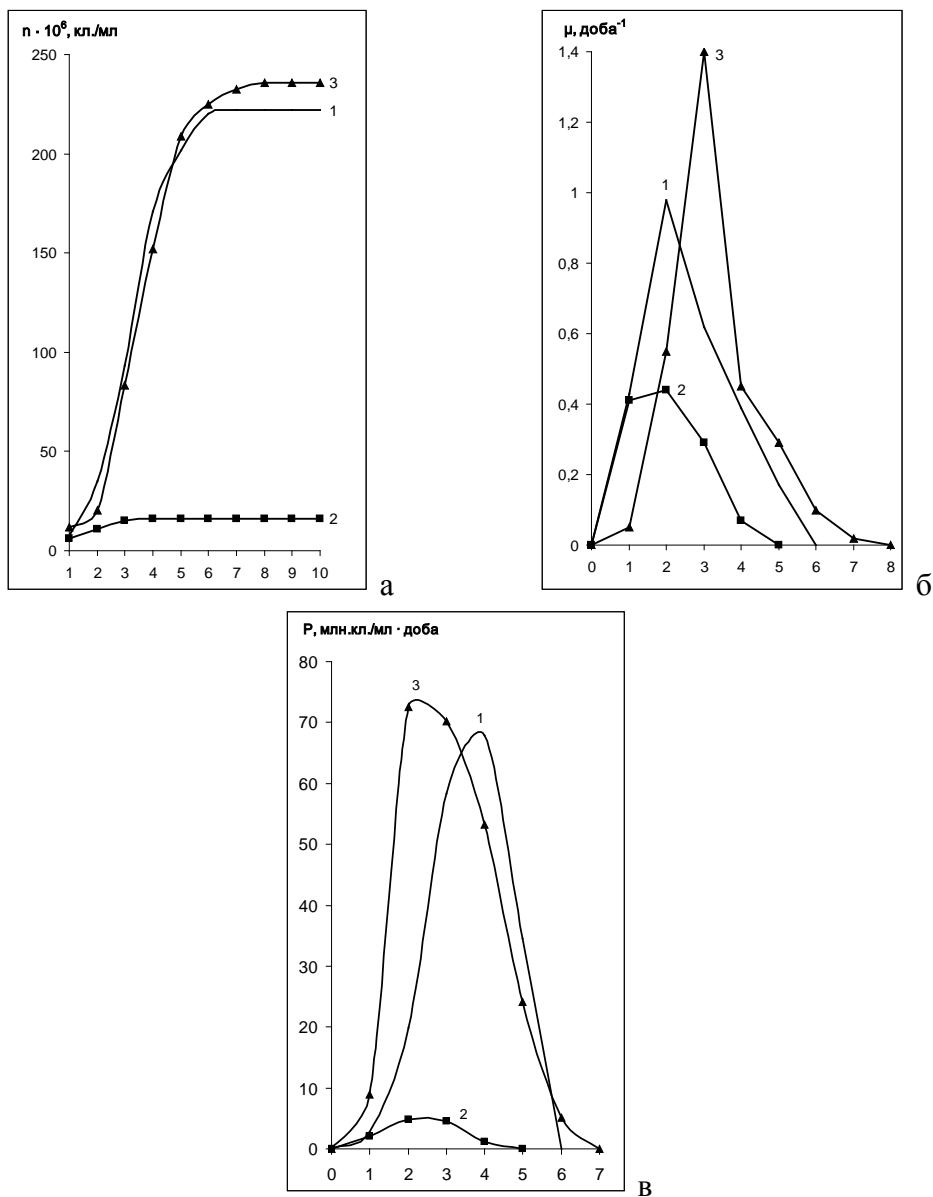


Рис 3. Ростові характеристики культур: а – крива росту; б – питома швидкість росту (μ); в – продуктивність (P); 1 – *Monoraphidium* sp. IBASU-A шт. 574 на середовищі Тамія; 2 – на середовищі Бурреллі; 3 – *Chlorella vulgaris* Beijer. IBASU-A шт. 189 (контроль) на середовищі Тамія

Одним з важливих показників при відборі штамів для потреб біоенергетики є високий вміст ліпідів. Найбільший вміст цих речовин мають деякі представники родин *Chlorellaceae*, *Scenedesmaceae* та *Botryococcaceae*, наприклад *Scenedesmus* sp. (53%), *Chlorella vulgaris* (56%), *Botryococcus braunii* Kütz. (65–70%) тощо (Spolaor et al., 2006; Chisti, 2007;

Deng et al., 2009; Getachew et al., 2020). Визначена нами загальна кількість ліпідів *Monoraphidium* sp. шт. 574 становила 33,65% сухого залишку (Tsarenko et al., 2020). Це дещо нижче за таку у зазначених вище видів, однак значно вище порівняно з перспективними для промислового використання штамми роду *Monoraphidium*. Загалом, вміст ліпідів у відомих олієвмістних водоростей роду *Monoraphidium* та представників родини *Selenastraceae* (*Ankistrodesmus* Corda, *Podahedriella* Hindák, *Selenastrum* Reinsch) змінюється в межах 15,9–52,0% (Yang et al., 2012; Bogen et al., 2013a, b; Sathya, Srisudha, 2013; Holbook et al., 2014; Patidar et al., 2014; Diaz et al., 2015; Shrivastav et al., 2015; Wu et al., 2015; Figuera et al., 2016; Che et al., 2017; Sehgal et al., 2019; Getachev et al., 2020).

Якісний та кількісний склад жирних кислот (ЖК) також є одним з ключових показників вихідної сировини для виробництва біодизеля (Knothe, 2009; Nascimento et al., 2013). Аналіз ефірів ЖК з використанням методу газорідинної хроматографії виявив у жирнокислотному профілі біомаси *Monoraphidium* sp. шт. 574 наявність чотирьох провідних ЖК, а саме: насиченої (НЖК) пальмітинової (C16:0), мононенасиченої (МНЖК) олеїнової (C18:1), поліненасичених (ПНЖК) – лінолевої (C18:2n-6) та ліноленової (C18:3n-3). Це співпадає з результатами інших авторів, які вказують на кількісне переважання у складі ліпідів біомаси водоростей роду *Monoraphidium* ЖК з довжиною вуглеводневої ланки C16-C18 (див. таблицю), що вважається найперспективнішим для виробництва біопалива (Bogen et al., 2013a, b).

Таблиця. Склад головних жирних кислот відомих біотехнологічних штамів видів водоростей роду *Monoraphidium*

Вид, штам	Головні жирні кислоти	Літературні дані
<i>Monoraphidium</i> sp. IBASU-A 574	C16:0, C18:1, C18:2, C18:3	
<i>Monoraphidium contortum</i> (Thur.) Komárk.-Legn. SAG 47.80	C16:0, C18:1, C18:2, C18:3; C16:4; C18:4	Bogen et al., 2013a, b; Lang et al., 2011
<i>M. contortum</i> G7	C16:0, C18:1, C18:2, C18:3	Sathya, Srisudha, 2013
<i>M. contortum</i> 21.37	C16:0, C18:1	Massimi, Kirkwood, 2016
<i>M. dybowskii</i> (Wolosz.) Hindák et Komárk.-Legn. SAG 202-2e	C16:0, C16:1, C18:1, C18:2	Bogen et al., 2013a, b
<i>M. dybowskii</i> XJ 435	C16:0, C18:1, C18:2	Wu et al., 2015
<i>M. dybowskii</i> XJ 151	C16:0, C18:1, C18:2, C18:3	Wu et al., 2015
<i>M. dybowskii</i> C29	C16:0, C18:1, C18:2, C18:3	Yang et al., 2012

<i>Monoraphidium griffithii</i> (Berk.) Komárk.-Legn. SAG 202-13	C16:0, C18:1 , C18:2, C18:3, C16:4, C18:4	Bogen et al., 2013a, b; Lang et al., 2011
<i>M. griffithii</i> 20.47	C16:0, C18:1	Massimi, Kirkwood, 2016
<i>M. minutum</i> (Nägeli) Komárk.-Legn.	C16:0, C18:1 , C18:2, C18:3	Patidar et al., 2014
<i>M. neglectum</i> Heyning et Krienitz SAG 48.87	C16:0, C18:1, C18:2 , C18:3; C16:4	Bogen et al., 2013a, b; Lang et al., 2011
<i>M. neglectum</i> SAG 2006	C16:0 , C18:1,	Krienitz, Wirth, 2006
<i>M. pusillum</i> (Printz) Komárk.-Legn. XJ 486	C16:0, C18:1, C18:2	Wu et al., 2015
<i>M. terrestre</i> (Bristol) Krienitz et Klein SAG 49.87	C16:0, C18:1, C18:2 , C18:3, C16:4	Bogen et al., 2013a, b
<i>M. tortile</i> (W.West et G.S.West) Komárk.-Legn. SAG 16.81	C16:0, C18:1 , C18:3	Bogen et al., 2013 a, b
<i>Monoraphidium</i> sp., Dek 19	C16:0, C18:1, C18:2 , C18:3,	Holbrook et al., 2014
<i>Monoraphidium</i> sp.	C16:0 , C18:1, C18:2 , C18:3	Shrivastav et al., 2015
<i>Monoraphidium</i> sp.	C16:0, C18:1 , C18:2, C18:3	Diaz et al., 2015
<i>Monoraphidium</i> sp.	C16:0, C18:1 , C18:2, C18:3	Figuera et al., 2016
<i>Monoraphidium</i> sp.	C16:0 , C18:1, C16:4 , C18:4	Řezanka et al., 1917
<i>Monoraphidium</i> sp. QLY-1	C16:0, C18:1, C18:2; C16:4, C16:4	Zhao et al., 2016
<i>Monoraphidium</i> sp. FXY-10	C16:0, C18:1 , C18:3; C16:4	Yu et al., 2012
<i>Monoraphidium</i> sp. QLY-1	C16:0, C18:1, C18:2, C18:3	Li et al., 2017
<i>Monoraphidium</i> sp. 17.013	C16:0, C18:1 , C16:4	Massimi, Kirkwood, 2016
<i>Monoraphidium</i> sp. 19.15	C16:0, C18:1 , C16:4	Massimi, Kirkwood, 2016
<i>Monoraphidium</i> sp. XJ 176	C16:0, C18:1 , C18:2, C18:3	Wu et al., 2015

Примітка: Умовні позначення жирних кислот (ЖК): C16:0 – пальмітинова; C16:1 – пальмітоолеїнова; C16:4 – гексадекатетраєнова (виявлена в окремих штаммах); C18:1 – олеїнова; C18:2 – лінолева; C18:3 – ліноленова. Жирним шрифтом виділені ЖК, частка яких становить більше 15%.

Так, для відомих біотехнологічних штамів *Monoraphidium contortum* (Thur.) Komárk.-Legn., *M. dybowskii* (Wołosz.) Hindák et Komárk.-Legn., *M. griffithii* (Berk.) Komárk.-Legn., *M. minutum* (Nägeli) Komárk.-Legn., *M. neglectum* Heyning et Krienitz, *M. pusillum* (Printz) Komárk.-Legn. та

Monoraphidium sp. характерним є домінування пальмітинової (C16:0) НЖК (17,7–48,94%) та олеїнової (C18:1) МНЖК (16,09–57,6%), рідше лінолевої (C18:2) та ліноленової (C18:3) ПНЖК (4,1–26,0% та 5,0–13,9% відповідно) (Krienitz, Wirth, 2006; Bogen et al., 2013a, b; Patidar et al., 2014; Diaz et al., 2015; Shrivastav et al., 2015; Wu et al., 2015; Figuera et al., 2016 та ін.). Кількісне переважання НЖК та МНЖК у складі ліпідів обумовлює високу якість сировини для виробництва біодизеля (Knothe, 2008). Значний вміст довголанцюгових ПНЖК – лінолевої (C18:2n-6) та ліноленової (C18:3n-3), так званих ω 3- і ω 6-кислот, необхідних (есенціальних) для підтримки життєдіяльності тварин і людини, вказує на цінність біомаси водоростей як сировини для харчової та фармацевтичної промисловостей (Spolaore et al., 2006; Zolotoryova et al., 2008; Brennan, Owende, 2010; Řezanka, 2017). Окрім цього, деякі штами видів роду *Monoraphidium* (*M. contortum*, *M. dybowskii*, *M. griffithii*, *Monoraphidium* sp.) здатні за певних умов культивування продукувати відносно значну кількість довголанцюгових гексадекатрієнової (C16:4 ω -3) (10,4–19,9%) та стеаридонової (C18:4 ω -3) (8,7–34,7%) ПНЖК, які представляють велику цінність для комерційного застосування водоростей (Lang et al., 2011; Bogen et al., 2013a, b; Massimi, Kirkwood, 2016; Che et al., 2017; Řezanka et al., 2017). Разом з цим літературні дані засвідчують значну варіабельність якісного та кількісного складу ЖК, що обумовлено як біологічними властивостями окремих штамів, так і різними умовами їх вирощування, наприклад авто-, міксо- та гетеротрофного культивування водоростей у лабораторних умовах або в біореакторах та промислових установках (Yu et al., 2012; Chaichalerm et al., 2012; Bogen et al., 2013a, b; Patidar et al., 2014; Shrivastav et al., 2015; Lari et al., 2016; Zhao et al., 2016 та ін.).

Наявна також інформація, що вказує на залежність формування жирнокислотного профілю ліпідів від фази життєвого циклу водоростей (Nascimento et al., 2013; Chaudhary et al., 2014). На прикладі досліджень динаміки накопичення різних видів ЖК у біомасі перспективних штамів *Chlorella vulgaris*, *Desmodesmus armatus* (Chodat) E.Hegew. та *Desmodesmus* sp. (= *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Bréb.) показано домінування НЖК у всіх видів у логарифмічній фазі та збільшення вмісту ПНЖК на стаціонарній фазі росту (Chaudhary et al., 2014). Аналогічна динаміка кількісних показників ЖК спостерігалася нами в експериментах з *Monoraphidium* sp. шт. 574 (рис. 4). За період інтенсивного росту вдвічі більшим, ніж на початку експерименту, і становив 36,01% сухого залишку. Виявлена закономірність підтверджує необхідність проведення таких досліджень для досліджуваного штаму після 10 діб культивування вміст МНЖК (C18:1) був найвищим і сягав 43%. При цьому показники кількості НЖК (C16:0) та ПНЖК (C18:2 і C18:3) виявилися практично однаковими і становили 17,38 та 18,13% відповідно.

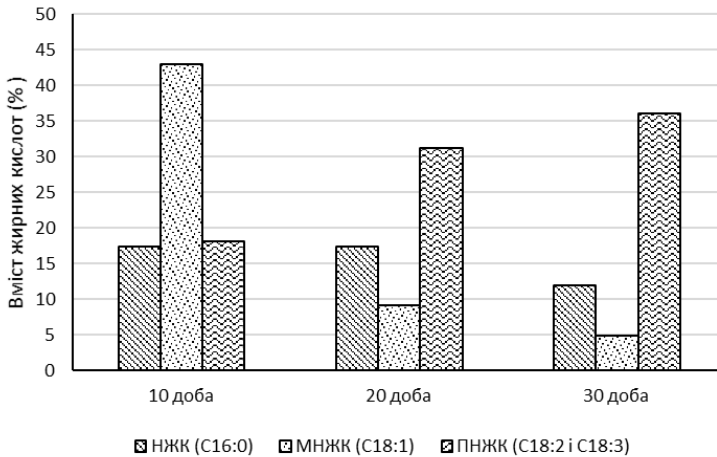


Рис.4. Динаміка відносного накопичення ЖК за період росту дослідженого штаму

Після 20 діб культивування кількість МНЖК (C18:1) різко знизилася і залишалася незначною до кінця експерименту. Водночас кількість ПНЖК (C18:2 і C18:3) почала зростати і досягла 33,18%, але вміст НЖК (C16:0) не змінився. Після 30 діб культивування вміст ПНЖК (C18:2 і C18:3) був встановлення оптимального терміну вирощування водоростей і забезпечення найбільшого виходу цільового продукту.

Висновки

Проведено дослідження інтенсивності росту та біологічних особливостей регіонального штаму *Monoraphidium* sp. IBASU-A 574, адаптованого до кліматичних умов помірної зони, з метою оцінки його біотехнологічного потенціалу. Визначено характер його росту та кінетичні характеристики (питома швидкість росту і продуктивність) у порівнянні з відомим продуцентом біомаси *Chlorella vulgaris* Beijer. IBASU-A 189 (=CALU 157). Встановлено, що активний ріст *Monoraphidium* sp. шт. 574 співставний з інтенсивністю росту відомого продуцента і характеризується параметрами (максимальна кількість клітин – 248 млн·мл⁻¹, питома швидкість росту – 1,4 доби⁻¹, продуктивність – 72,5 млн кл·мл⁻¹·доби⁻¹), які дозволяють розглядати його як перспективний продуцент біомаси для виробництва біодизеля.

Аналіз жирнокислотного профілю ліпідів досліджуваного штаму методом газорідинної хроматографії виявив наявність провідного комплексу з пальмітинової (C16:0), олеїнової (C18:1), лінолевої (C18:2) та ліноленової (C18:3) жирних кислот, кількісне співвідношення яких обумовлює високу якість сировини для виробництва біопалива. В експериментах відзначено динаміку формування жирнокислотного складу ліпідів в залежності від стадії росту культури, що підтверджує необхідність

проведення таких досліджень для визначення оптимального терміну вирощування водоростей і забезпечення найбільшого виходу цільового продукту. На ранніх стадіях культивування ліпідний склад біомаси *Monoraphidium* sp. IBASU-A 574 містить більше пальмітинової (C16:0) та олеїнової (C18:1) жирних кислот, що важливо для виробництва біодизеля високої якості, і навпаки, на пізніх стадіях культивування відзначено переважання незамінних для людини та тварин довголанцюжкових поліненасичених кислот – лінолевої (C18:2) та ліноленової (C18:3). Таким чином, колекція біотехнологічних штамів IBASU-A поповнилася новим вітчизняним штамом – перспективним продуцентом біомаси як сировини для виробництва біопалива та цінних органічних речовин для харчової та фармацевтичної промисловостей.

Список літератури

- Algal culturing techniques*. 2005. Ed. Andersen R.A. Amsterdam: Elsevier Acad. Press. 578 p.
- Amin S. 2009. Review on biofuel oil and gas production from microalgae. *Energy Convers. Manag.* 50: 1834–1840.
- Bischoff H.W., Bold H.C. 1963. Phycological studies. IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algae species. *Univ. Texas Publ.* 6318: 1–95.
- Bogen C., Al-Dilami A., Albersmeier A., Wichmann J., Grundmann M., Rupp O., Lauersen K.J., Blifernez-Klassen O., Kalinowski J., Goesmann A., Mussnug J.H., Kruse O. 2013a. Reconstruction of the lipid metabolism for the microalga *Monoraphidium neglectum* from its genome sequence reveals characteristics suitable for biofuel production. *BMC Genomics* 14(1): 926–930.
- Bogen C., Klassen V., Wichmann J., La Russa M., Doebbe A., Grundmann M., Uronen P., Kruse O., Mussnug J.H. 2013b. Identification of *Monoraphidium contortum* as a promising species for liquid biofuel production. *Biores. Technol.* 133: 622–626.
- Bohnenberger J., Crossetti L.O. 2014. Influence of temperature and nutrient content on lipid production in freshwater microalgae cultures. *An. Acad. Bras. Cienc.* 86(3):1239–1248.
- Borysova E.V., Tsarenko P.M. 2004. Microalgae Culture Collection of Ukraine (IBASU-A). *Nova Hedw.* 79(1–2): 127–134.
- Borysova O.V., Tsarenko P.M., Konishchuk M.O. 2014. *Microalgae Culture Collection IBASU-A*. Kyiv. 110 p. [Борисова О.В., Царенко П.М., Конішук О.М. 2014. Колекція культур мікроводоростей IBASU-A. Київ. 110 с.].
- Borysova O.V., Tsarenko P.M., Konishchuk M.O. 2016. Microalgae Culture Collection (IBASU-A) as an object of national heritage of Ukraine. *Ukr. Bot. J.* 73(5): 453–460. [Борисова О.В., Царенко П.М., Конішук М.О. 2016. Колекція культур мікроводоростей (IBASU-A) як об'єкт національного надбання України. *Укр. бот. журн.* 73(5): 453–466].
- Brennan L., Owende P. 2010. Biofuel from algae – A review of technologies for production, processing and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sust. Energy Rev.* 14: 557–577.

- Chaichalerm S., Pokethitiyook P., Yuan W., Meetam M., Sritong K., Pugkaew W., Kungvansaichol K., Kruatrachue M., Damrongphol P. 2012. Culture of microalgal strains isolated from natural habitats in Thailand in various enriched media. *Appl. Energy*. 89(1): 296–302.
- Chaudhary R., Khattar J.I.S., Sing D.P. 2014. Microalgae as feedstock for biofuel, biomass yield, lipid content and fatty acid composition as selection criteria. *Int. J. Power Renew. Energy Syst.* 1: 62–69.
- Che R., Huang L., Xu J-W., Zhao P., Li T., Ma H., Yu X. 2017. Effect of fulvic acid induction on the physiology, metabolism, and lipid biosynthesis-related gene transcription of *Monoraphidium* sp. FXY-10. *Biores. Technol.* 227: 324–334.
- Chisti Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25: 294–306.
- Deng X., Yajun L., Fei X. 2009. Microalgae: A promising feedstock for biodiesel. *Afr. J. Microbiol. Res.* 3(13): 1008–1014.
- Diaz G.C., Cruz Y.R., Carlis R.G., de Paula R.C.V., Aranda D.A.G., Dario M.A.G., Marassi G.S., Furtado N.C. 2015. Cultivation of microalgae *Monoraphidium* sp., in the plant pilot the Grant Valle Bio Energy, for biodiesel production. *Nat. Sci.* 7: 370–378.
- Figuera A., Reyes Y., González R., Paula R., Basto L., Aranda D. 2016. Monitoring the consumption of *Monoraphidium* sp. microalgae: Characterization of algal biomass produced. *Revista Latinoamericana Biotech. Ambient. Algal.* 7(2): 42–56.
- Getachew D., Mulugeta K., Gemechu G., Murugesan K. 2020. Values and drawbacks of biofuel production from microalgae. *Appl. Biotechnol.* 7(1): 1–6.
- Holbrook G., Dayidson Z., Tatara R.A., Ziemer N.L., Rosentrater K.R., Grayburn S. 2014. Use of the microalga *Monoraphidium* sp. grown in wastewater as a feedstock for biodiesel: Cultivation and fuel characteristics. *Appl. Energy*. 131: 386–393.
- Knothe G. 2009. Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty esters composition. *Energy Environ. Sci.* 2: 759–766.
- Krienitz L., Wirth M. 2006. The high content of polyunsaturated fatty acids in *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae) and its implication for food web interactions, freshwater aquaculture and biotechnology. *Limnology*. 6: 204–210.
- Kvitko K.V., Borshchevskayan N.N., Chunaev A.S., Tugarinov V.V. 1983. In: *Cultivation of algal collection strain*. Leningrad: Leningrad State Univ. Publ. 28–56. [Квитко К.В., Борщевская Т.Н., Чунаев А.С., Тугаринов В.В. 1983. Петергофская коллекция штаммов водорослей. В кн.: *Культивирование коллекционных штаммов водорослей*. Л.: Изд-во Ленинград. ун-та. С. 28–56].
- Lang L., Hodac L., Friedl T., Feussner I. 2011. Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. *BMC Plant Biol.* 11(1): 124.
- Lari Z., Moradi-Kheibari N., Ahmadzadeh H., Abrishamchi P., Moheimani N.R., Murry M.A. 2016. Bioprocesses engineering of microalgae to optimize lipid production through nutrient management. *J. Appl. Phycol.* <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0884-6>

- Li D., Zhao Y., Ding W., Zhao P., Xu J.-W., Li T., Ma H., Yu X. 2017. A strategy for promoting lipid production in green microalgae *Monoraphidium sp.* QLY-1 by combined melatonin and photoinduction. *Biores. Technol.* 23: 104–112.
- Massimi R., Kirkwood A.E. 2016. Screening microalgae isolated from urban storm- and wastewater systems as feedstock for biofuel. *PeerJ peerj.* 2396(12). <https://doi.org/10.7717/peerj.2396>
- Mata T.M., Martins A.A., Caetano N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew. Sust., Energ. Rev.* 14: 217–232.
- Methods on physiological and biochemical studies of microalgae in hydrobiological practice.* Ed. A.V. Topachevsky 1975. Kyiv: Naukova Dumka. 247 p. [Методи фізіолого-біохімічного дослідження водорослей в гідробиологічній практиці. 1975. Під ред. А.В. Топачевського. Київ: Наук. думка. 247 с].
- Nascimento I.A., Marques S.S.I., Cabanelas I.T.D., Pereira S.A., Druzian J.I., de Souza C.O., Vich D.V., de Carvalho G.C., Nascimento M.A. 2013. Screening microalgae strains for biodiesel production and estimation of fuel quality based on fatty acid profiles as selective criteria. *Bioenergy Res.* 6: 1–13.
- Patidar S.K., Mitra M., George B., Soundarya R., Mishra S. 2014. Potential *Monoraphidium minutum* for carbon sequestration and lipid production in response to varying growth mode. *Biores. Technol.* 172: 32–40.
- Řezanka T., Nedbalová L., Lukavský J., Střížek A., Sigler K. 2017. Pilot cultivation of the green alga *Monoraphidium sp.* producing a high content of polyunsaturated fatty acids in a low-temperature environment. *Algal Res.* 22: 160–165.
- Sathya S., Srisudha S. 2013. Isolation and identification of freshwater microalgae strain – potential for biofuel production. *Int. J. Recent Sci. Res.* 4(9): 1432–1437.
- Sehgal A., Goswami K., Pal M., Chikkaputtaiah C., Chetia P., Boruah H.P.D. 2019. Morpho-taxonomic, genetic, and biochemical characterization of freshwater microalgae as potential biodiesel feedstock. *Biotech.* 9(4): 1–17.
- Sheehan J., Dunahay T.G., Beneman J.R., Roessler P.G. 1998. *A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: biodiesel from algae. Close-out report.* Golden, CO: NREL. 296 p.
- Shrivastav A., Mishra S.K., Suh W.I., Farooq W., Moon M., Kim T.-H., Kumar K., Choi G.-G., Park M.S., Yang J.-W. 2015. Characterization of newly isolated oleaginous microalga *Monoraphidium sp.* for lipid production under different conditions. *Algal. Res.* 12: 289–294.
- Sorochinsky B., Blume Ya., Sozinov O. 2010. *Liquid biofuels: current state and tendencies.* Kyiv: DIA. 116 p. [Сорочинський Б.В., Блюм Я.Б., Созінов О.О. 2010. Підкі біопалива: сучасний стан та тенденції. Київ: ДІА. 116 с.].
- Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101: 87–96.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A., Kumar S. 2013. MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30(12): 2725–2729.

- Trenkenshu R.P. 2005. Simplest models of microalgal growth. Batch culture. *Mar. Ecol.* 67: 89–97.
[Тренкеншу Р.П. 2005. Простейшие модели роста микроводорослей. Периодическая культура. *Экол. моря.* 67: 89–97].
- Tsarenko P.M., Borysova O.V., Blume Ya.B. 2011. Microalgae as bioenergetic object: IBASU-A collection species – perspective producers of biomass as the source of raw stuff for biofuel. *Visn. Nat. Acad. Sci. Ukraine.* 5: 49–54. [Царенко П.М., Борисова О.В., Блюм Я.Б. 2011. Микроводорості як об'єкт біоенергетики. Види колекції IBASU-A – перспективні продуценти біомаси як джерела сировини для біопалива. *Вісн. НАН України.* 5: 49–54].
- Tsarenko P., Borysova O., Blume Ya. 2016. High biomass producers and promising candidates for biodiesel production from microalgae collection IBASU-A (Ukraine). *Oceanol. Hydrobiol. Stud.* 45(1): 79–85.
- Tsarenko P.M., Borysova O.V., Korkhovyi V.I., Blume Ya.B. 2020. High-efficiency Ukrainian strains of microalgae for biodiesel fuel production (Overview). *Open Agricult. J.* 14: 9–218.
- Tsarenko P.M., Konishchuk M.O., Korkhovoy V.I., Kostikov I.Yu., Blume Ya.B. 2017. Fatty acid composition of cocoid green algae as a basis for energy and primary products potential. 1. *Chlorella* and *Acutodesmus*-like microalgae (*Chlorophyta*). *Int. J. Algae.* 19(4): 367–384.
<https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v19.i4.70>
- White T.J., Bruns T., Lee S.J.W.T., Teylor J. 1990. Application and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.* London: Acad. Press. 18(1): 315–322.
- Woertz I., Feffer A., Lundquist T., Nelson Y. 2009. Algae grown on dairy and municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and lipid production for biofuel feedstock. *J. Environ. Eng.* 135(11): 1115–1122.
- Wu L., Xu L., Hu C. 2015. Screening and characterization of oleaginous microalgal species from North Xinjiang. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25(6): 910–917.
- Yang X., Liu P., Hao X., Shi S., Zhang S. 2012. Characterization and identification of freshwater microalgal strain toward biofuel production. *BioResources.* 7(1): 686–695.
- Yu X., Zhao P., He C., Li J., Tang X., Zhou J., Huang Z., Zhou J., Huang Z. 2012. Isolation of a novel strain of *Monoraphidium* sp. and characterization of its potential application as biodiesel feedstock. *Biores. Technol.* 121: 256–262.
- Zhao Y., Li D., Ding K., Che R., Xu J.-W., Zhao P., Li T., Ma H., Yu X. 2016. Production of biomass and lipids by the oleaginous microalgae *Monoraphidium* sp. QLY-1 through heterotrophic cultivation and photo-chemical modulator induction. *Biores. Technol.* 211: 669–676.
- Zhao P., Yu X., Li J., Tang X., Huang Z. 2014. Enhancing lipid productivity by co-cultivation of *Chlorella* sp. U4341 and *Monoraphidium* sp. FXY-10. *J. Biosci Bioeng.* 118(1):72–77.
- Zhu L. 2015. Microalgal culture strategies for biofuels production: A review. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 9: 801–814.
- Zolotaryova O.K., Schnyukova E.L., Sivash O.O., Mykhailenko N.P. 2008. Perspectives of the use of microalgae in biotechnology. Kyiv: Altepress. 234 p. [Золотарьова О.К., Шнюкова Є.К., Сиваш О.О., Михайленко Н.Ф. 2008. *Перспективи використання мікроводоростей у біотехнології.* Київ: Альтерпрес. 234 с.]

Підписала до друку О.К. Золотарьова

Tsarenko P.M.¹, Borysova O.V.¹, Kharkhota M.A.², Zelena L.B.², Konischuk M.O.¹, Burova O.V.¹, Blume Ya.B.³ 2022. ***Monoraphidium* sp. IBASU-A 574 (*Selenastraceae*, *Chlorophyta*) - a promising producer of biomass for bioenergy.** *Algologia*. 32(1): 88–104.

¹M.G. Kholodny Institute of Botany NAS of Ukraine,

2 Tereschenkivska Str., Kyiv 01601, Ukraine

²D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine

154 Acad. Zabolotny Str., Kyiv 03680, Ukraine

³Institute of Food Biotechnology and Genomics of NAS of Ukraine,

2a Osypovskogo Str., Kyiv, 04123, Ukraine

The present studies were carried out to evaluate a potential biofuel application of the native strain *Monoraphidium* sp. IBASU-A 574 (*Selenastraceae*, *Chlorophyta*) adapted to the temperate zone climatic conditions. This strain was isolated from a small freshwater lake situated in Kyiv-city (Ukraine) by the reached culture method for obtaining desired strains of different species with high growth rate. It was identified based on its morphological characterization under light microscopy and 18S rRNA sequence analysis. Its culture's growth, kinetic characteristics (specific growth rate and productivity) and biological peculiarities of the investigated strain were studied in comparison with the well-known biomass producer *Chlorella vulgaris* Beijer. CALU 157 under the same autotrophic cultivating conditions with using the modified Tamiya medium. It was established an active growth of *Monoraphidium* sp. IBASU-A 574 which was practically equal to the well-known producer and characterized by following parameters: a maximum cell density of $248 \cdot 10^6$ cells \cdot mL⁻¹, the specific growth rate of 1.4 days⁻¹ and productivity of $72.5 \cdot 10^6$ cells \cdot mL⁻¹ \cdot days⁻¹. The results of gas-liquid chromatography analysis showed that a fatty acid profile of this microalga included a complex of palmitic (C16: 0), oleic (C18: 1), linoleic (C18: 2) and linolenic (C18: 3) major fatty acids with suitable proportion for developing biodiesel feedstocks. Moreover, there was considerable variation in formation of its fatty acid composition depending on the stage of growth, that confirmed the necessity for such studies to determine both optimal time for growing algae and gaining maximum yield of target products. Thus, *Monoraphidium* sp. IBASU-A 574 was found to be the promising producer of biomass for bioenergetic industry due to obtained data of its growth characteristics and suitable fatty acid profile of lipids.

Key words: microalgae, *Monoraphidium* sp., strain, collection IBASU-A, lipids, fatty acid profile, biodiesel