

ных исследований №3 «Энергетические аспекты глубокой переработки ископаемого и возобновляемого глеродсодержащего сырья»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биокатализаторы на основе иммобилизованных клеток микроорганизмов в процессах получения биоэтанола и биобутанола. / Ефременко Е.Н. [и др.] // Катализ в промышленности, 2010. - Т. 5. - С.70-76.
2. Иммобилизованный биокатализатор, способ его получения и способ получения молочной кислоты с использованием этого биокатализатора / Ефременко Е.Н. [и др.] // Патент РФ на изобретение № 2253677, 2002.
3. *Rhizopus oryzae* fungus cells producing L(+)-lactic acid: kinetic and metabolic parameters of free and PVA-cryogel-entrapped mycelium./ Efremenko E.N. [et al] // Appl Microb Biotech, 2006. -V.72. - P.480-485.
4. Co-production of fumaricacid and chitin from a nitrogen-rich lignocellulosic material – dairy manure – using a pelletized filamentous fungus *Rhizopus oryzae* ATCC 20344 / Liao W. [et al] // Bioresour Technol, 2008. - V. 99. - P. 5859–5866.
5. Fermentative production of fumaric acid from *Eucalyptus globulus* wood hydrolyzates / Rodríguez-López. [et al] // J Chem Technol Biotech, 2012. -V. 87. - P. 1036–1040.
6. Production of fumaric acid by fermentation of enzymatic hydrolysates derived from cassava bagasse / Carta F.S. [et al] // Bioresour Technol, 1999. - V. 68. - P. 23–28.
7. Two-stage utilization of corn straw by *Rhizopus oryzae* for fumaric acid production. / Xu Q. [et al] // Bioresour Technol, 2010. - V. 101. - P. 6262-6266.

□Авторы статьи:

Сенько
Ольга Витальевна,
научный сотрудник каф. химической
энзимологии МГУ, мл. научн. сотр.
Института биохимической физики
им. Н.М. Эмануэля РАН
Email:senko@enzyme.chem.msu.ru

Степанов
Николай Алексеевич,
канд.техн.наук, младший научный
сотрудник (Институт биохимической
физики им. Н.М. Эмануэля РАН)
Email: baltazar8181@mail.ru

Лягин Илья Владимирович,
к.х.н., старший научный сотрудник
каф. химической энзимологии МГУ
Email: lyagin@mail.ru

Маслова
Ольга Васильевна,
младший научный сотрудник каф.
химической энзимологии МГУ
Email: olga-still@mail.ru

Ефременко
Елена Николаевна,
докт.биол.наук, проф., зав. лаб.
«Экобиокатализа» каф. химической
энзимологии МГУ, в.н.с. Института
биохимической физики им. Н.М.
Эмануэля РАН
Email:elenae_efremenko@list.ru

УДК 579.695

Ф. Т. Мамедова, А.Б. Никольская, Е.Н. Ефременко

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СТОЧНЫХ ВОД ДЛЯ НАКОПЛЕНИЯ БИОМАССЫ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

В настоящее время биомасса микроводорослей представляет большой интерес как один из ценных источников возобновляемого сырья для получения различных коммерчески значимых продуктов, используемых в химической, нефтехимической и пищевой промышленностях [1]. Для культивирования микроводорослей обычно используют синтетические минеральные среды. Однако при использовании таких сред себестоимость получаемой биомассы оказывается достаточно высокой, поскольку требует использования различных реагентов, их взвешивания, растворения, транспортировки к месту наращивания микроводорослей. Одним из способов удешевления производства является комплексное использование полученной биомассы, ее глубокая трансформация в

различные конечные продукты. Другим способом повышения экономической эффективности представляется выращивание клеток на сточных водах, загрязненных различными соединениями, способными выполнять роль биогенов для микроводорослей. Это позволит удешевить питательную среду и решить проблему очистки сточных вод и накопления целевой биомассы. В этой связи актуальна разработка методов культивирования микроводорослей как концентраторов биогенных элементов, содержащихся в сточных водах.

Целью данной работы явилось исследование возможности использования сточных вод для накопления биомассы микроводорослей на примере зеленой микроводоросли *Chlorella vulgaris* C-1.

Материалы и методы. Объектом исследования в работе были клетки зеленой микроводоросли *Chlorella vulgaris* C-1. Культивирование клеток осуществляли на модельных питательных средах, имитирующих сточные воды разной очистки. Состав раствора №1, имитирующего бытовые сточные воды после биологической очистки, был следующим (мг/л): NaCl – 7; CaCl₂ – 4; MgSO₄·7H₂O – 2; NH₄Cl – 10; K₂HPO₄·3H₂O – 28,4; KH₂PO₄ – 8,5; Na₂HPO₄ – 33,4. Состав раствора №2, имитирующего сточные воды с высоким содержанием органических веществ после механической очистки, был таким (мг/л): ацетат Na – 5000; цитрат Na – 0,1; дрожжевой экстракт – 1; NH₄Cl – 245,2; CaCl₂ – 446,8; NaCl – 123; MgSO₄·7H₂O – 751,3; NaHCO₃ – 137,7; K₂HPO₄·3H₂O – 393,1; KH₂PO₄ – 62,2; FeSO₄·7H₂O – 15,26; MnCl₂·4H₂O – 10,1; H₃BO₃ – 1,6. Также в 1 л данного модельного раствора вносили 1 мл раствора микроэлементов следующего состава (в мг/л): NiSO₄·6H₂O – 121,7; CuSO₄·5H₂O – 39,1; ZnSO₄·7H₂O – 88,3 [3, 4]. Модельные растворы №3 и №4 были получены путем разбавления раствора №2 в 2 и 4 раза соответственно. pH всех растворов было 7,2 ± 7,5. Культивирование проводилось в колбах объемом 750 мл, заполненных 100 мл соответствующей питательной среды в аэробных условиях в статическом режиме при температуре

21 ± 1 °C и постоянном освещении лампами Osram Fluora 77 (30 Вт). Инкубацию клеток вносили в 10%-ном соотношении к объему среды. Рост клеток контролировали спектрофотометрически по оптической плотности культуральной суспензии при длине волны 540 нм (спектрофотометр Agilent UV-853, Германия).

Определение биохимического состава клеток. Экстракция липидов из биомассы и их дальнейшее определение осуществлялись по методу Фольша [2]. Осадки биомассы после экстракции липидов высушивались при 50 °C в течение 20 ч. Экстракция белков и их определение проводились по методу, описанному в [3]. Осадки биомассы после экстракции белков высушивались при 60 °C в течение 20 ч. Определение углеводов проводилось с использованием фенольного метода [4].

Определение кинетических параметров процессов. При проведении расчетов предполагалось, что изучалась закрытая (периодическая) система, в которой существенные для роста компоненты в процессе роста клеток не поступали в систему дополнительно и не покидали ее в течение каждого цикла. В закрытой системе скорость роста биомассы в конечном итоге стремится к нулю либо из-за недостатка субстрата, либо из-за ингибирования продуктом при его дальнейшем накоплении.

С учетом вышеизложенного положения дель-

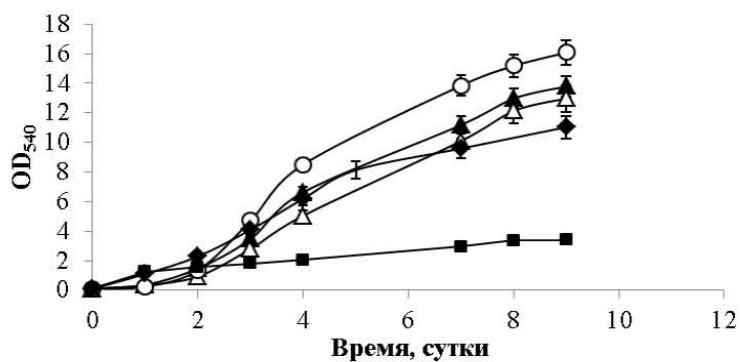


Рис. 1. Кинетика накопления биомассы *Chlorella vulgaris* C-1 в образцах №1 (■), №2 (▲), №3 (Δ), №4 (○) модельных сточных вод и в среде Тамийя, содержащей глюкозу (◆). OD₅₄₀ – оптическая плотность при длине волны 540 нм.

Таблица 1. Параметры процесса накопления биомассы *Chlorella vulgaris* в модельных стоках и в среде Тамийя, содержащей глюкозу.

Питательные среды	Раствор №1	Раствор №2	Раствор №3	Раствор №4	Тамийя, содержащая глюкозу
μ , сут ⁻¹	0,11	0,41	0,35	0,50	0,42
C, г/л/сут	0,41	1,52	1,43	1,77	1,53

Таблица 2. Биохимический состав биомассы клеток микроводоросли *Chlorella vulgaris* C-1, выращенной в модельных стоках.

№ раствора	Содержание, %		
	липидов	белков	углеводов
2	18,9±1,1	33,7±3,2	45,2±1,9
3	19,1±2,3	24,7±1,5	53,3±2,7
4	27,0±2,5	41,6±2,7	30,4±3,5

ная скорость роста μ представляет собой скорость роста единицы популяции:

$$dC = \mu C dt, \quad dC/dt = \mu C,$$

где t - время роста культуры, сут; C - концентрация клеток в момент времени t , г/л; μ - удельная скорость роста, сут⁻¹.

На участке экспоненциального (логарифмического) роста удельная скорость роста постоянна, она определялась из уравнения:

$$\ln C = \ln C_0 + \mu t,$$

где C_0 - начальная концентрация клеток, г/л.

Продуктивность процесса по биомассе Q_c , г/л/сут, рассчитывалась по формуле:

$$Q_c = C/t,$$

где C - концентрация клеток в момент времени t , г/л.

Результаты и обсуждение. Было установлено (рис.1, табл.1), что сточные воды, особенно включающие в свой состав органические вещества, могут быть эффективно использованы в качестве питательных сред для накопления клеток микроводорослей. Наличие органических веществ позволило более чем в 3 раза повысить скорость роста клеток и продуктивность системы по биомассе. Основной прирост клеток *Chlorella vulgaris* С-1 происходил в течение первых 8-ми суток культивирования. Необходимо также отметить, что в сравнении с результатами, полученными при культивировании клеток в питательной среде Тамии с добавлением глюкозы в качестве источника органического углерода, получено, что рост клеток микроводорослей на модельной сточной воде, содержащей органические вещества (раствор №2), практически не отличался от роста клеток на среде Тамии. Однако при разбавлении раствора

№2 в 4 раза (раствор №4) скорость роста составила 0,50 сут⁻¹, а продуктивность по биомассе 1,77 г/л/сут, что превысило данные, полученные для среды Тамии в 1,2 раза.

Анализ биохимического состава микроводоросли *Chlorella vulgaris* С-1, накопленной на модельных сточных водах, содержащих органические вещества (табл. 2), показал, что наибольшая доля липидов и белков накапливалась в биомассе клеток, культивирование которых проводилось в образце модельной сточной воды №4, то есть при максимальном из исследованных разбавлении модельных сточных вод после их механической очистки. Максимальная концентрация углеводов в биомассе клеток *Chlorella vulgaris* С-1 была получена в случае использования для культивирования раствора №3.

Вероятно, используя различные образцы сточных вод, а также изменяя концентрации веществ в них путем разбавления, можно накапливать биомассу микроводорослей требуемого биохимического состава. В целом очевиден огромный потенциал этого способа получения биомассы микроводорослей, способных расти в гетеротрофных или миксотрофных условиях, для ее последующей трансформации в различные продукты для нефтехимической, нефтеперерабатывающей и топливной промышленности.

Работа поддержана государственным контрактом № 16.526.11.6003 Федеральной целевой программы "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Efremenko E.N. Production of biofuels from pretreated microalgae biomass by anaerobic fermentation with immobilized *Clostridium acetobutylicum* cells / Efremenko E.N., Nikolskaya A.B., Lyagin I.V., Senko O.V., Makhlis T.A., Stepanov N.A., Maslova O.V., Mamedova F., Varfolomeyev S.D. // *Bioresour. Technol.*, 2012. – V.114. – P.342-348.
2. Folch J. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues / Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. // *J. Biol. Chem.*, 1957. – V. 226. – P.497–509.
3. Досон Р. Справочник биохимика / Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К.; перевод с англ. В.Л. Друцы и О.Н. Королевой. – М.: Мир, 1991. – 544 с
4. Dubois M. Colorimetric method for determination of sugars and related substances / Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. // *Anal. Chem.*, 1956. – V.28. – P.350–356.

□Авторы статьи:

Мамедова
Фахрия Тахир-кызы,
аспирант каф. химической
энзимологии МГУ
E-mail: faxriya-m@yandex.ru

Никольская
Анна Борисовна,
инженер-исследователь
(Институт Биохимической физики
имени Н.М. Эмануэля РАН)
E-mail: anickolskaya@mail.ru

Ефременко
Елена Николаевна,
докт.биол.наук, проф., зав. лаб.
«Экобиокатализа» каф. химической
энзимологии МГУ, в.н.с. Института
биохимической физики им. Н.М.
Эмануэля РАН
Email:elena_efremenko@list.ru,