

ПОЛИМЕРНЫЕ, БИООРГАНИЧЕСКИЕ И ГИБРИДНЫЕ НАНОМАТЕРИАЛЫ

УДК 582.263; 661.72; 547.458; 546.824-31

ПОВЫШЕНИЕ ПРОДУКТИВНОСТИ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ *Chlorella vulgaris* ЗА СЧЕТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГИДРОГЕЛЯ С НАНОЧАСТИЦАМИ

© 2023 г. К. В. Горин^{1,*}, В. М. Пожидаев¹, С. А. Тихомиров¹,
О. А. Кондратьев¹, М. Г. Петрова^{1,2}, Р. Г. Василов¹

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

²Московский политехнический университет, Москва, Россия

*E-mail: gkvbio@gmail.com

Поступила в редакцию 05.10.2022 г.

После доработки 05.10.2022 г.

Принята к публикации 17.10.2022 г.

Фототрофные микроорганизмы считаются одним из перспективных источников возобновляемого сырья, которое может использоваться для получения энергии и различных ценных продуктов. Проведены исследования по культивированию микроводоросли *Chlorella vulgaris* GKV 1 в фотобиореакторах горизонтального типа с использованием гидрогеля с наночастицами диоксида титана размером 84 ± 20 нм и адаптивного освещения. Продуктивность микроводоросли *C. vulgaris* с использованием гидрогеля с наночастицами и адаптивного освещения превышает контроль на 53.4%. Проведен анализ липидов полученной биомассы на качественный состав метиловых эфиров жирных кислот. Полимерный материал исследован на Курчатовском специализированном источнике синхротронного излучения (“КИСИ-Курчатов”).

DOI: 10.56304/S1992722323010028

ВВЕДЕНИЕ

Развитие глобальной биоэкономики создает потребность в новых видах сырья и процессах, направленных на получение топлива и сырья. Использование микроводорослей может играть значительную роль в этих процессах. Попытки повысить ценность биомассы направлены на увеличение содержания липидов и углеводов, как предпочтительные исходные компоненты для конверсии в топливо и другие более ценные продукты. В последнее время внимание сосредоточено на получении микроводорослей с повышенным содержанием белка [1].

Отметим, что фототрофные микроорганизмы широко используются в различных технологиях: по очистке сточных вод, обессоливанию воды, утилизации дымовых газов, образующихся при сжигании ископаемого топлива [2].

При проектировании фотобиореакторов (ФБР) решаются такие задачи, как перемешивание и массоперенос в растущей культуре, создание необходимых температуры и pH, но доминирующим фактором по-прежнему остаются проникающая способность и распределение света. Естественный солнечный свет часто используют для уменьшения себестоимости выращивания, однако падающий свет неизбежно изменяется в зависимости от погоды, суточного цикла и времени года. Плотность

светового потока фотонов солнечного света составляет более 2000 мкмоль m^2s^{-1} . Однако оксигенные фотомикроорганизмы могут достичь теоретически максимальной эффективности преобразования солнечной энергии в 8–10%. Также важным параметром являются спектральные характеристики света, так как только солнечная радиация в диапазоне 400–700 нм – фотосинтетически активная радиация (ФАР) – может использоваться, составляя 50% от всего солнечного света. Излучение, выходящее за пределы ФАР, является основной причиной повышения температуры при выращивании [3].

Кроме того, УФ-диапазон солнечного света смертелен для клеток. Распределение интенсивности света неравномерно внутри ФБР из-за поглощения и рассеяния в растущей культуре [4], а ослабление излучения зависит от длины волны света, концентрации клеток, геометрии ФБР и проникающей способности. В некоторых случаях свет может проникать только на несколько миллиметров, когда плотность культуры микроводорослей достигает более $10 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ в ФБР [3].

В лабораторной практике для культивирования фототрофных микроорганизмов используют ФБР различных конструкций.

Цилиндрические колонные ФБР бывают с барботажем и без. Обычно неподвижные распы-

лители различной конструкции (в виде кольца или дисков, снабженных отверстиями и форсунками или с равномерно расположенными диффузорами из кремнезема, которые работают как пористые твердые тела) для газовой фазы расположены в нижней части ФБР. Расход подаваемого газа составляет от 0.1 до 1.0 объема газа на объем культивируемой среды в минуту. Диаметр таких систем для культивирования, как правило, составляет от 7 до 24 см, а для освещения используют флуоресцентные или светодиодные лампы.

Плоские ФБР — это распространенный тип реакторов для исследования микроводорослей. Они состоят из двух параллельных пластин с небольшим расстоянием между ними, большой поверхности для светового излучения и поэтому обладают высокой эффективностью использования света, а также позволяют избежать “темновых зон”. При разных подходах плоские ФБР размещают вертикально, горизонтально или под определенным углом. Подобно цилиндрическим ФБР с барботажем плоские ФБР могут эксплуатироваться как эрлифтные ФБР с разделенными зонами, одна из которых аэрируемая, подаваемый воздух может распределяться через барботеры, трубки или мембраны для перемешивания растущей культуры и подачи воздушной смеси с диоксидом углерода. В ФБР такого типа часто используются различные перегородки для улучшения перемешивания и распределения света, светодиодное освещение, а также натриевые лампы, люминесцентные, галогенные, неоновые лампы. Освещение может быть как с одной, так и с двух сторон, в некоторых конструкциях второй источник света заменяют на зеркальную поверхность. Освещенность в ФБР такого типа поддерживается на уровне от 80 до 400 мкмоль $\text{м}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ [5].

В [6] для увеличения массообмена и исключения застойных зон и осаждения биомассы микроводорослей представлен инновационный лабораторный плоский ФБР вертикального эрлифтного типа с уникальной асимметричной U-образной формой объемом 7.2 л. Его эффективность была подтверждена культивированием *Chlorella sorokiniana* ATCC 22521 — в течение пяти суток выход по оптической плотности при 750 нм составил пять единиц.

Лабораторные ФБР с мешалкой изготавливают из стекла с освещением с внешней стороны. Иногда дополнительный источник освещения помещают внутрь ФБР. Также нередко в таких типах ФБР для освещения используют оптическое волокно, погруженное внутрь растущей культуры.

Трубчатые ФБР состоят из двух частей, соединенных между собой насосами: “солнечного ресивера” и эрлифтной системы. Большая часть фотосинтетических реакций происходит в “солнечном ресивере”, состоящем из прозрачных труб из полимерного материала или стекла раз-

личного диаметра и длины, установленных в различных положениях, для обеспечения минимизации занимаемой площади. Вторая часть — “пузырьковая колонна” служит для интенсификации газового обмена между растущей культурой и атмосферой для более полного удаления накопившегося в процессе роста кислорода. Как правило, диоксид углерода подается в конце “пузырьковой колонны” — начале “солнечного ресивера” для увеличения времени его пребывания в системе. Трубчатые ФБР лабораторного масштаба также могут быть упрощенной версии — иметь только часть солнечного приемника с упрощенной насосной системой, что снижает затраты.

Другим типом ФБР является использование для их изготовления полимерных материалов, из которых можно получать ФБР различной конструкции: в виде мешков, подвешивающихся вертикально, под углом, размещающихся непосредственно на поверхности моря для перемешивания с помощью волнового движения. Но, как правило, такие системы имеют недостаточное перемешивание, что может привести к снижению выхода.

Тонкослойные ФБР каскадного типа представляют собой открытые ФБР, в которых растущая суспензия микроводорослей направляется вниз самотеком под действием силы тяжести по каналам, расположенным под определенным регулируемым углом. Суспензия собирается в рециркуляционную емкость и насосом заново подается наверх канала. Регуляция объемного расхода и угла установки каналов позволяет регулировать толщину слоя растущей культуры, который составляет 0.5–1 см. ФБР такого типа могут иметь один или несколько каналов и располагаются, как правило, в теплицах [5].

Для увеличения поглощения диоксида углерода разрабатываются лабораторные ФБР с мембранной системой [7].

В последнее время стали культивировать микроводоросли, иммобилизованные в гидрогелях, что позволяет сократить потребление воды во время выращивания и обеспечить потенциальный физический барьер против бактериальной микрофлоры. Также используется 3D-биопечать для создания различных гидрогелевых структур для выращивания ряда штаммов микроводорослей. Для оптимизации распространения света в гидрогелях их выполняют в форме кораллов. Однако выращивание микроводорослей в системах на основе гидрогелей все еще требует развития в отношении газового обмена и метаболитов, необходимых для жизнедеятельности микроводорослей [8].

В [9] было показано положительное влияние гидрогелей на рост микроводорослей с наночастицами оксида алюминия и оксида циркония при культивировании в колбах, тогда увеличение продуктивности достигло 20%.

В настоящей работе для увеличения продуктивности микроводоросли *Chlorella vulgaris* в плоском ФБР горизонтального типа использовали гидрогель с наночастицами диоксида титана, а также адаптивную систему освещения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В работе использовали йота-карагинан (Special Ingredients, Великобритания), поливиниловый спирт (ПВС) 22000 г/моль (Авилон-КомпаниХим, Россия), диоксид титана чистотой 99.5% (BDT, Россия).

Культура и условия выращивания. В качестве культуры выбран штамм микроводоросли *Chlorella vulgaris* GKV 1 из коллекции НИЦ “Курчатовский институт”, широко используемый для различных исследовательских задач.

Культивирование осуществляли в горизонтальном плоском ФБР общим объемом 5 л, выполненном из прозрачного органического стекла толщиной 5 мм. Объем культивируемой среды вместе с посевным материалом составлял 4.3 л. Перемешивание осуществлялось за счет прокачивания среды с помощью водяного насоса с расходом 1000 мл/мин. Температура при культивировании – $24 \pm 1^\circ\text{C}$. В качестве питательной среды использовали модифицированную среду Bold's Basal Media (BBM) следующего состава г/л: KNO_3 – 1.25, KH_2PO_4 – 1.25, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1, CaCl_2 – 0.0835. Добавляли 1 мл стокового раствора микроэлементов. Его состав по Пфеннигу мг/л: EDTA – 5000, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 2000, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 100, MnCl_2 – 30, H_3BO_3 – 300, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 200, CuCl_2 – 10, $\text{NiCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 20, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 20 [9]. pH питательной среды доводили до 7.0. В качестве источника освещения использовали флуоресцентную лампу мощностью 108 Вт. Ее устанавливали на таком расстоянии, чтобы обеспечивался световой поток в 100 мкмоль фотонов $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ на освещаемой поверхности ФБР. Барботаж атмосферным воздухом осуществлялся с помощью компрессора с расходом 250 мл/мин. Для первого ФБР (с гелем) организовали адаптивное освещение, внизу ФБР был помещен измеритель ФАР Almemo 2450 с датчиком FLA 623 PS (Ahlborn, Германия), по которому осуществляли досветку до необходимого уровня освещенности растущей культуры с помощью светодиодов (smd 2835 IP 23).

При культивировании измеряли pH с помощью pH-метра Seven Compact (Mettler Toledo, Швейцария) и оптическую плотность при 750 нм на спектрофотометре Varioscan LUX (Thermo Fisher Scientific, США).

Приготовление гидрогеля. В качестве оптического материала синтезировали гель с содержанием диоксида титана (TiO_2) 0.25% (с кристаллической структурой рутил, размер частиц 84 ± 20 нм) по модифицированной методике [10]: ПВС (2.5%) и каррагинан (2.5%) гомогенизировали при 70°C и перемешивали на магнитной мешалке 400 об./мин 240 и 45 мин соответственно, затем смешивали на магнитной мешалке при 400 об./мин 60 мин, добавляли диоксид титана и гомогенизировали на магнитной мешалке при 400 об./мин 60 мин, затем заливали в чистую плоскую емкость для образования плоского геля, остужали при комнатной температуре, затем выполняли четыре цикла замораживание/оттаивание $-24/+24^\circ\text{C}$ в течение четырех суток, затем сушили при 35°C двое суток. Из полученного геля вырезали квадрат со стороной 200 мм, толщиной 5 мм и помещали в первый ФБР.

Определение плавучести гидрогеля. Плавучесть гидрогелей определяли путем помещения их в цилиндр на 100 мл со средой для культивирования микроводорослей и измерения глубины погружения. Измерения начинали проводить через 100 мин после помещения гидрогелей в цилиндр, давая им набухнуть.

Анализ состава метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК). Для анализа содержания МЭЖК необходима лиофильно высушенная биомасса. Сбор биомассы проводили центрифугированием при 7500 об./мин (центрифуга Awel MF 20, ротор AMF 20–8 RFID, Франция) в течение 10 мин при 20°C , дважды промывали дистиллированной водой для удаления адсорбированных солей. Собранную влажную биомассу лиофильно сушили на лиофильной сушилке FreeZone 2.5 (Labconco, США) в течение 12 ч.

Получение МЭЖК проводили прямым метанолизом согласно методу [11].

Анализ МЭЖК проводили методом газовой хроматографии на газовом хроматографе Bruker 430 GC (Varian Inc. США), снабженном пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой Select TM Biodiesel (30 м ×

Таблица 1. Результаты измерений плавучести гидрогелей

Образец гидрогеля	Результаты измерения глубины погружения гидрогелей, см		
	100 мин	200 мин	300 мин
Каррагинан + ПВС + частицы TiO_2	0.2	0.3	0.3
Каррагинан + ПВС	0.2	0.3	0.3

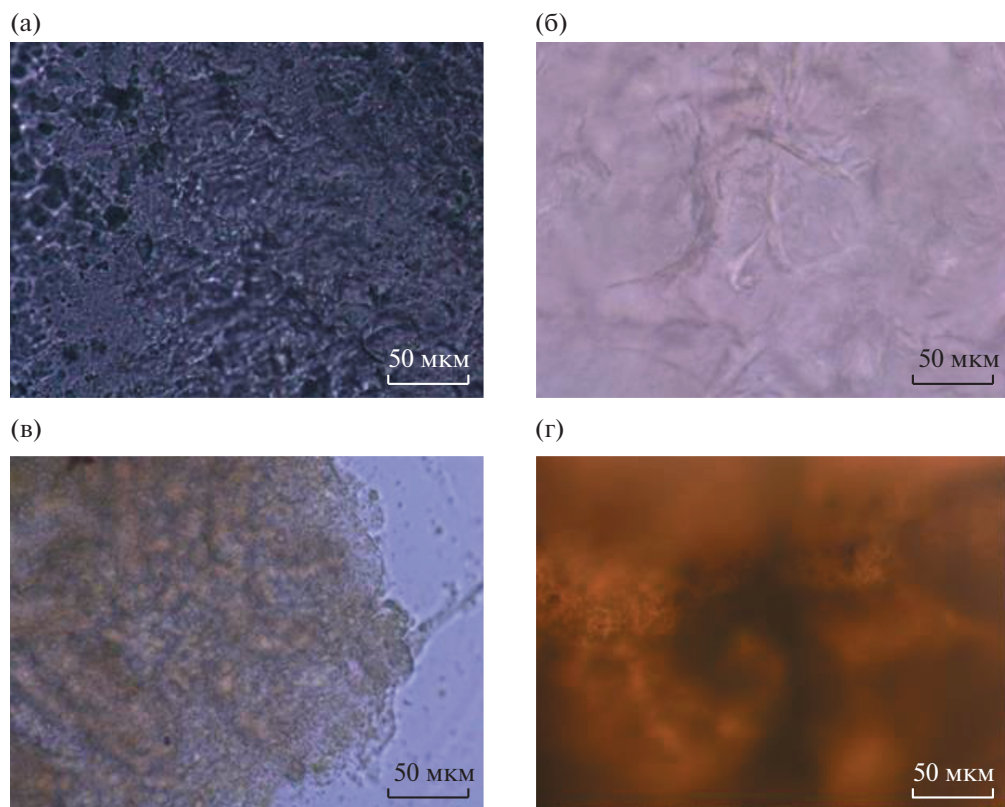


Рис. 1. Микрофотографии гидрогеля в проходящем свете до и после культивирования, увеличение $\times 400$: а – приготовленный высушенный гель, б – набухший гель до культивирования, в – гель после культивирования, г – высушенный гель после культивирования.

$\times 0.32 \text{ мм} \times 0.25 \text{ мкм}$). Количество вводимой пробы – 1 мкл [12].

МЭЖК идентифицировали по относительному времени удерживания на колонке компонентов смеси в сравнении со стандартом, количественное содержание индивидуальных жирных кислот (ЖК) определяли методом нормализации площадей.

Проведение рентгеновских исследований. Измерения проводили на Курчатовском специализи-

рованном источнике синхротронного излучения (“КИСИ-Курчатов”). Использовали методику записи кривых дифракционного отражения на

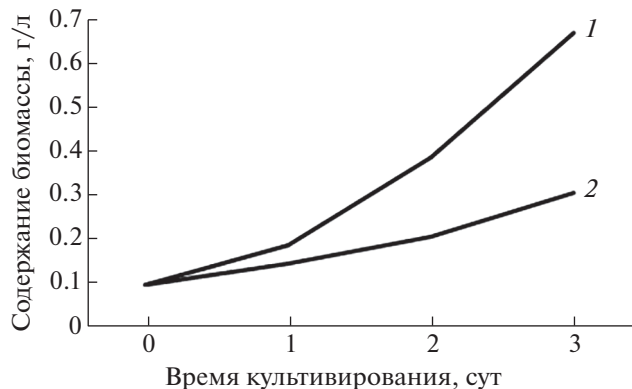


Рис. 2. Изменение концентрации биомассы *C. vulgaris* в фотобиореакторах со временем при культивировании: 1 – с гелем, 2 – без геля.

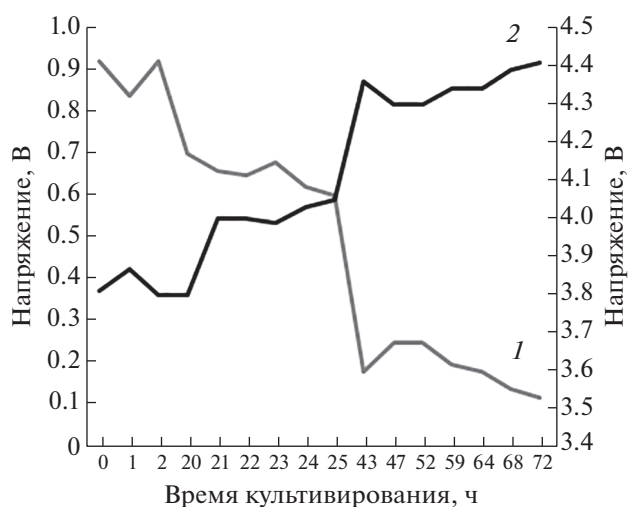


Рис. 3. Изменение выходного напряжения с датчика фотосинтетически активной радиации и управляющего напряжения на диоды при культивировании *C. vulgaris* в фотобиореакторе: 1 – выходное напряжение с ФАР-датчика, 2 – управляющее напряжение на диодах.

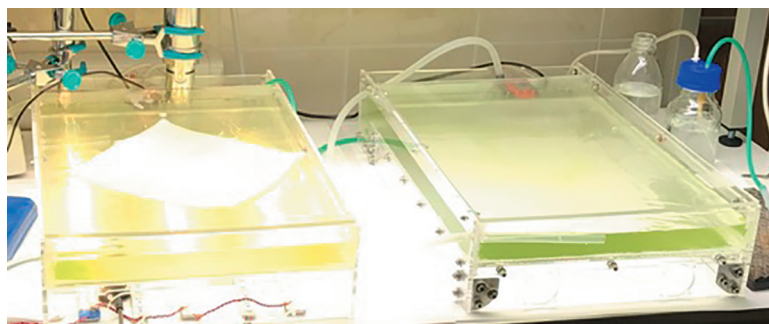


Рис. 4. Рост культуры в фотобиореакторах.

просвет. Длина волны используемого синхротронного излучения составляла 1.5 Å.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Плаучесть гидрогеля является одним из основных факторов, определяющих его положение в ФБР, результаты данного параметра представлены в табл. 1.

В ходе исследования выявлено, что гидрогель как без частиц, так и с частицами диоксида титана погружается на небольшую глубину до 0.3 см. При этом наличие наночастиц в геле концентрацией 0.25% не способствовало увеличению глубины погружения гидрогеля. Гидрогели изучали в высушенном и набухшем состоянии (рис. 1).

Продуктивность *C. vulgaris* при культивировании с использованием гидрогеля и адаптивного освещения была выше на 53.4% по сравнению с контролем (рис. 2).

Это можно объяснить несколькими факторами: применением адаптивного освещения, позволяющего поддерживать необходимый уровень освещенности независимо от плотности культуры (рис. 3), и оптического материала (гидрогеля) с высоким альбедо, что создает еще две отражающих поверхности в толще растущей культуры, что в совокупности увеличивает освещенность (рис. 4).

Согласно приведенным на рис. 3 данным с ростом плотности растущей суспензии микроводорослей уменьшается проникающая способность света, что приводит к возрастанию управляющего напряжения на диодах и, соответственно, увеличению интенсивности освещения от светодиодов, расположенных в нижней камере ФБР.

Отметим, что при культивировании с гидрогелем он выступает в роли “механической мешалки”, препятствующей образованию “застойных зон” и оседанию клеток, наблюдаемых в центре и углах ФБР без геля, и способствует лучшему перемешиванию растущей культуры в ФБР.

Изменение pH было не сильным, хотя в случае с гидрогелем, защелачивание выше из-за более интенсивного роста культуры (рис. 5).

В составе липидов выявлены восемь ЖК (табл. 2). Ненасыщенные ЖК составляли более 70% как при культивировании с гидрогелем, так и в его отсутствие, причем почти 40% составляли полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК): линолевая и линоленовая. Интересен тот факт, что содержания как отдельных ЖК, так и насыщенных и ненасыщенных ЖК в обоих вариантах культивирования различаются незначительно.

В европейских стандартах на биодизель прописаны четкие ограничения на содержание ПНЖК, доля которых не должна превышать 12% для линоленовой кислоты, 1% для четырех и более двойных связей. В проведенном исследовании установлено, что содержание линоленовой кислоты в количестве ЖК в липидах биомассы *C. vulgaris* было на уровне 16%.

На рис. 6 виден характерный дифракционный пик при 1.4 Å⁻¹ для гидрогеля, состоящего из каррагинана, ПВС и наночастиц TiO₂ [5].

Таблица 2. Состав МЭЖК биомассы *C. vulgaris*

Жирная кислота	Содержание ЖК, % (от суммы ЖК)	
	С гелем	Без геля
Пентадеценная кислота (15:1)	15.34	14.15
Пальмитиновая кислота (16:0)	14.20	12.29
Пальмитолеиновая кислота (16:1)	4.86	5.83
Гептадеценная кислота (17:1)	11.79	12.82
Стеариновая кислота (18:0)	11.23	10.03
Олеиновая кислота (18:1)	4.38	5.54
Линолевая кислота (18:2)	22.64	23.24
Линоленовая кислота (18:3)	15.56	16.10
Сумма насыщенных ЖК	25.43	22.32
Сумма ненасыщенных ЖК	74.57	77.68
Сумма мононенасыщенных ЖК	36.37	38.34
Сумма полиненасыщенных ЖК	38.20	39.34

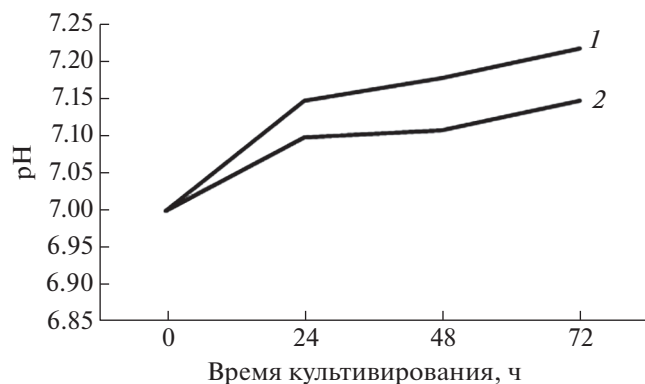


Рис. 5. Изменение pH в фотобиореакторах со временем при культивировании: 1 – с гелем, 2 – без геля.

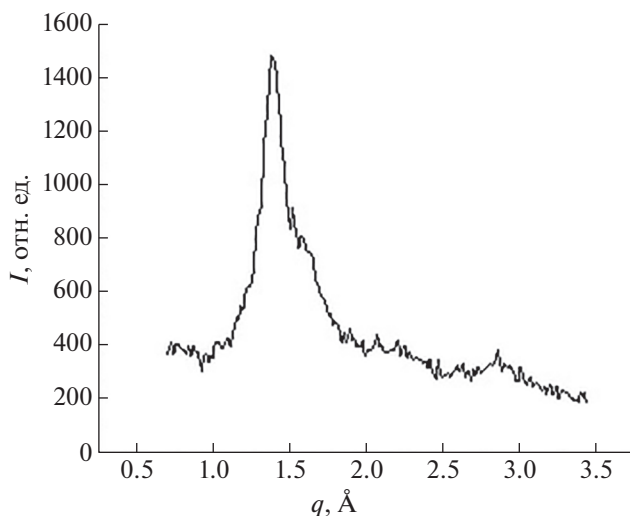


Рис. 6. Дифракционная кривая сухого гидрогеля с наночастицами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получены данные о возможности эффективного использования гидрогеля на основе каррагинана, ПВС и наночастиц диоксида титана и адаптивного освещения для увеличения продуктивности микроводоросли *C. vulgaris*, которая повысилась более чем на 50% по сравнению с контролем. Установлено, что содержание наночастиц диоксида титана в гидрогеле в количестве 0.25% не влияет на его плавучесть. Присутствие гидрогеля в культуральной среде при выращива-

нии также дает положительный эффект с точки зрения создания более подходящего гидродинамического режима в фотобиореакторе. Состав ЖК биомассы, полученной при культивировании с гидрогелем, и контроля различался незначительно. С помощью специализированного источника синхротронного излучения подтверждено присутствие наночастиц диоксида титана в гидрогеле.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках соглашения № 075-15-2021-1357.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wiatrowski M., Klein B., Davis R. et al.* // *Biofuel. Bioprod.* 2022. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-02098-3>
2. *Gotovtsev P., Komova A., Gorin K. et al.* // *Energy Technol. Assessm.* 2019. V. 31. P. 132. <https://doi.org/10.1016/J.SETA.2018.12.0>
3. *Huang Q., Jiang F., Wang L. et al.* // *Engineer.* 2017. V. 3. P. 318. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2017.03.020>
4. *Quan Y., Pehkonen S., Ray M.* // *Ind. Eng. Chem. Res.* 2004. V. 43. P. 948. <https://doi.org/10.1021/ie0304210>
5. *Benner P., Meier L., Pfeffer A. et al.* // *Bioproc. Biosyst. Eng.* 2022. V. 45. P. 791. <https://doi.org/10.1007/s00449-022-02711-1>
6. *Fuchs T., Arnold N., Garbe D. et al.* // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021. V. 9. P. 1. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.697354>
7. *Senatore V., Buonerba A., Zarra T. et al.* // *Chemosph.* 2021. V. 273. P. 129682. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129682>
8. *Martin N., Bernat T., Dinasquet J. et al.* // *J. Appl. Physcol.* 2021. P. 2805. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02528-7>
9. *Gorin K., Badranova G., Gotovtsev P et al.* // *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 2018. P. 293. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/292/1/012051>
10. *Badranova G., Gotovtsev P., Zubavichus Y. et al.* // *J. Mol. Liq.* 2016. V. 223. P. 16. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.07.135>
11. *Liu J., Liu Y., Wang H. et al.* // *Technol.* 2015. V. 176. P. 284. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.094>
12. *Сергеева Я.Э., Мостова Е.Б., Горин К.В. и др.* // *Биотехнология.* 2017. Т. 33. № 1. С. 53.