

Висновки. Порівняння результатів дорожніх випробувань та результатів розрахунків на математичній моделі підтвердили адекватність математичної моделі руху автобуса з дизелем в режимах міського їздового циклу.

За допомогою дорожніх випробувань встановлено, що при використанні МЕРО відбувається підвищення масової витрати палива на 12% в порівнянні з традиційним нафтовим паливом. При цьому витрата палива в тепловому еквіваленті практично не змінюється.

За результатами дорожніх випробувань можна стверджувати, що метилові ефіри ріпакової олії суттєво розширюють паливну базу та можуть використовуватись як самостійне паливо для дизелів дорожніх транспортних засобів, зменшуючи використання палив нафтового походження.

1. Ковбасенко С.В. Перспективи виробництва і використання біодизельного палива в Україні / С.В. Ковбасенко, В.В. Сімоненко // Вісник НТУ, 2007. – №15. – Ч. 2. – С. 28–31.

2. Ковбасенко С.В. Експериментальні дослідження двигуна, який працює на традиційному та біодизельному паливах / С.В. Ковбасенко, В.В. Сімоненко // Вісник Національного транспортного університету. – К: НТУ, 2010. – Випуск 20. – С. 47–50.

3. Гутаревич Ю. Математична модель руху автобуса з дизелем в режимах міського їздового циклу при роботі на традиційному та біодизельних паливах / Ю. Гутаревич, С. Ковбасенко, В. Сімоненко // Systemy i ŋrodki transportu samochodowego. Wybrane zagadnienia / pod redakcijŋ naukowŋ Kazimierza Lejdy Monographia nr 4; Seria: Transport; Politechnika Rzeszowska im. Ignacego Jukaszewicza. – Rzeszyw: 2013. – С. 231–238.

4. *Автотранспортные средства.* Топливная экономичность. Методы испытаний: ГОСТ 20306 – 90. – [введен с 01.01.1992]. – М.: Изд-во стандартов, – 1991. – 34 с.

5. *Паливо дизельне.* Технічні умови. ДСТУ 3868-99 – [Чинний до 01-07-2014]. – К.: ДП Укр НД І НП "МАСМА", 1993. – 12 с. – (Національні стандарти України).

6. *Паливо моторне.* Ефіри метилові жирних кислот олій і жирів для дизельних двигунів. Технічні вимоги. ДСТУ 6081:2009 – [Чинний від 01-03-2010]. – К.: ДП Укр НД І НП "МАСМА", 2009. – 14 с. – (Національні стандарти України).

7. *Девянин С.Н.* Растительные масла и топлива на их основе для дизельных двигателей / С.Н. Девянин, В.А. Марков, В.Г. Семенов. – Х: Новое слово, 2007. – 452 с.

УДК 662.767.3

Н.Б.Голуб, канд.хім.наук, **І.І.Левтун** (Національний технічний університет України "КПІ", Київ)

Підвищення вмісту ліпідів у клітинах *Chlorella vulgaris*

Розглянуто вплив дії ультразвукового опромінення на розвиток культури Chlorella vulgaris та накопичення нею ліпідної фракції – сировини для одержання біодизельного палива. Визначено довжини хвиль ультразвукового опромінення, за яких не відбувається пригнічення росту біомаси мікроводорості. Встановлено раціональні параметри культивування (освітленість, подача CO₂, масообмін), за яких відбувається підвищення у 4 рази приріст біомаси та накопичення клітинами Chlorella vulgaris ліпідів до 70% по відношенню до культивування у стандартному середовищі Громова №6.

Ключові слова: мікроводорості, *Chlorella vulgaris*, ультразвукове опромінення, культивування, біодизельне паливо, ліпіди.

Рассмотрено влияние ультразвукового излучения на развитие культуры Chlorella vulgaris и накопление ее клетками липидной фракции – сырья для получения биодизельного топлива. Определены длины волн ультразвукового излучения, при которых не происходит угнетения роста биомассы микроводорослей. Установлены рациональные параметры процесса культивирования (освещенность, подача CO₂, массообмен), которые приводят к увеличению прироста биомассы в 4 раза и накоплению клетками Chlorella vulgaris липидов до 70% относительно культивирования на стандартной среде Громова №6.

Ключевые слова: микроводоросли, *Chlorella vulgaris*, ультразвуковое излучение, культивирование, биодизельное топливо, липиды.

В Україні щорічно споживається близько 200 мільйонів тонн умовного палива, при цьому власний видобуток становить лише 80 млн тонн [1]. При такому балансі власної та імпортованої

енергетичної сировини актуальною проблемою стає його заміна на відновлювані джерела енергії, важливим потенційним ресурсом якого може стати біопаливо. Енергетичним джерелом другого

покоління є мікроводорості; дослідженням та розробкою технологій виробництва з них біопалива широко займаються у світі [2–6].

Продуктивність водоростей набагато більша, ніж будь-якої сільськогосподарської культури. Вони характеризуються високим коефіцієнтом корисної дії (ККД) використання світла [7]. При цьому практично немає втрат біомаси. Клітини мікроводоростей синтезують відновлювану біоенергетичну сировину – ліпіди, які за допомогою стандартних технологічних процесів можуть бути перероблені у біодизельне паливо – замітник дизельного пального з нафти [8]. Загальний вміст ліпідів у клітинах водоростей коливається у значному діапазоні. При цьому кількість та якісний склад ліпідів залежать від умов технологічного процесу культивування мікроводоростей [7–10].

Процес продукування біомаси краще перебігає в оптимальних умовах культивування, а біосинтез підвищеного вмісту ліпідів у клітинах – за умов незбалансованості живильного середовища або за стресових умов. Тому дослідження максимально ефективних для накопичення біомаси та ліпідів стресових умов є актуальною проблемою для розробки технологій культивування мікроводоростей з метою їх подальшого використання для одержання біодизельного палива.

Мета роботи: визначення можливості використання ультразвукового опромінення для модифікації процесів культивування мікроводоростей з підвищеним вмістом ліпідної фракції.

Дія ультразвукового опромінення на клітину є стресовим фактором. В залежності від частоти, що використовується, його дія може привести як до прискорення процесів метаболізму, так і до загибелі клітин внаслідок кавітаційних процесів. Завданням дослідження було визначення частотного діапазону, за якого відбувається інтенсифікація дифузійних та каталітичних процесів, що приводить до збільшення інтенсивності накопичення біомаси мікроводоростей *Chlorella vulgaris* та ліпідів.

Матеріали та методи. Дослідження проводили за використання мікроводорості *Chlorella vulgaris* АСКУ 531-06, що одержана з колекції Київського національного університету ім. Т.Г.Шевченка. Вирощування мікроводорості проводили у фотореакторі: об'єм – 2 л, діаметр –

0,06 м, висота – 0,6 м. Для підтримання масообміну в реакторі використовували ерліфтну систему. Перемішування здійснювали повітрям при швидкості його подачі 0,6 дм³/хв. Вуглекислий газ із балону ($V = 1$ дм³) подавали 1 раз за добу. Освітлення здійснювали за допомогою світлодіодних ламп із довжиною хвилі червоного спектра 625–630 нм та синього 465–475 нм, співвідношення світлодіодів 1:1. Ультразвукове опромінення здійснювали за допомогою п'єзо-випромінювача та генератора прямокутних імпульсів з регульованою частотою 1 раз на добу. Температура культивування $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

Значення рН встановлювали за допомогою іонометра И-160 МИ (Росія).

Як живильне середовище використовували стандартне середовище Б.В.Громова №6. Вміст солей, г/дм³: 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 вносили з розрахунку 1 см³/дм³. Розчин мікроелементів, г/дм³: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 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.

Визначення концентрації клітин мікроводоростей проводили в камері Горяєва за використання стандартної методики [11] та за значенням оптичної густини суспензії, яку вимірювали при довжині хвилі 450 нм. Вимірювання оптичної густини здійснювали за допомогою спектрофотометра Ulab 102 (Китай).

Відфільтрування біомаси мікроводоростей проводили за допомогою установки вакуумної мікрофільтрації ПВФ-35/2 Б (Росія).

Висушування біомаси та ліпідів проводили у сушильній шафі 2В-151 (Росія) при 110°C . Масу мікроводоростей визначали за допомогою аналітичної ваги ВЛА-200г-М (Україна).

Визначення вмісту ліпідів у біомасі мікроводоростей виконувалося за методом Сокслета [12]. Вміст ліпідної фракції у біомасі мікроводоростей визначали за формулою:

$$x = \frac{a-b}{g} \cdot 100,$$

де x – вміст ліпідної фракції, %; a – маса колби з ліпідною фракцією, г; b – маса порожньої колби, г; g – маса наважки, г.

Результати та обговорення. Для визначення впливу ультразвукового опромінення на життєдіяльність клітин мікроводорості *Chlorella vulgaris* було досліджено опромінення частотою: 20; 22,5; 25 кГц (рис. 1).

Як видно з рис. 1, крива 2 при дії ультразвуку частотою 20 кГц лаг-фаза триває 7 діб. При цьому тривалість фази експонентного росту довша, ніж у випадку відсутності опромінення. Підвищення швидкості приросту можна пояснити створенням під дією опромінення мікроциркуляції живильних речовин біля мембрани клітини та збільшення її проникності внаслідок інтенсифікації транспортних систем клітини.

Зміна швидкості перенесення речовин через мембрану також призводить до деполяризації мембран. Потенціал спокою для *Chlorella vulgaris* складає 120-150 мВ, при короткочасній дії ультразвукового опромінення заряд мембрани змінюється до 0,68 мВ. Зміна потенціалу, в свою чергу, сприяє прискоренню транспорту аніонів, що містять азот, фосфор та інші необхідні іони, через мембрани. Надходження нітрогену викликає збільшення біосинтезу білка і прискорення росту

клітин. Збільшення концентрації біомаси у 10 разів по відношенню до контрольного дослідження (табл. 1) свідчить про прискорення фотосинтетичних процесів і, як наслідок, підвищення продукції біомаси.

За використання опромінення культури частотою 22,5 кГц (рис. 1, крива 3), на відміну від дії частоти у 20 кГц, швидкість приросту клітин у експонентній фазі така ж, як і за використання стандартних умов. Збільшення концентрації клітин по відношенню до стаціонарних умов відбувається за рахунок більш тривалої фази експонентного росту. Тобто підвищення частоти опромінення знижує приріст біомаси мікроводоростей. Оптична густина суспензії у 2,5 рази нижча, ніж при дії ультразвуку частотою 20 кГц (табл. 1). При цьому кількість біомаси збільшується лише в 4 рази по відношенню до контрольного зразка. Тобто більша частота призводить до змін метаболізму, які пов'язані як з позитивним впливом на клітину мікропотоків живильних речовин, так і негативним – руйнуванням клітинних структур під дією кавітації. Це підтверджується даними щодо приросту біомаси за дії частоти 25 кГц.

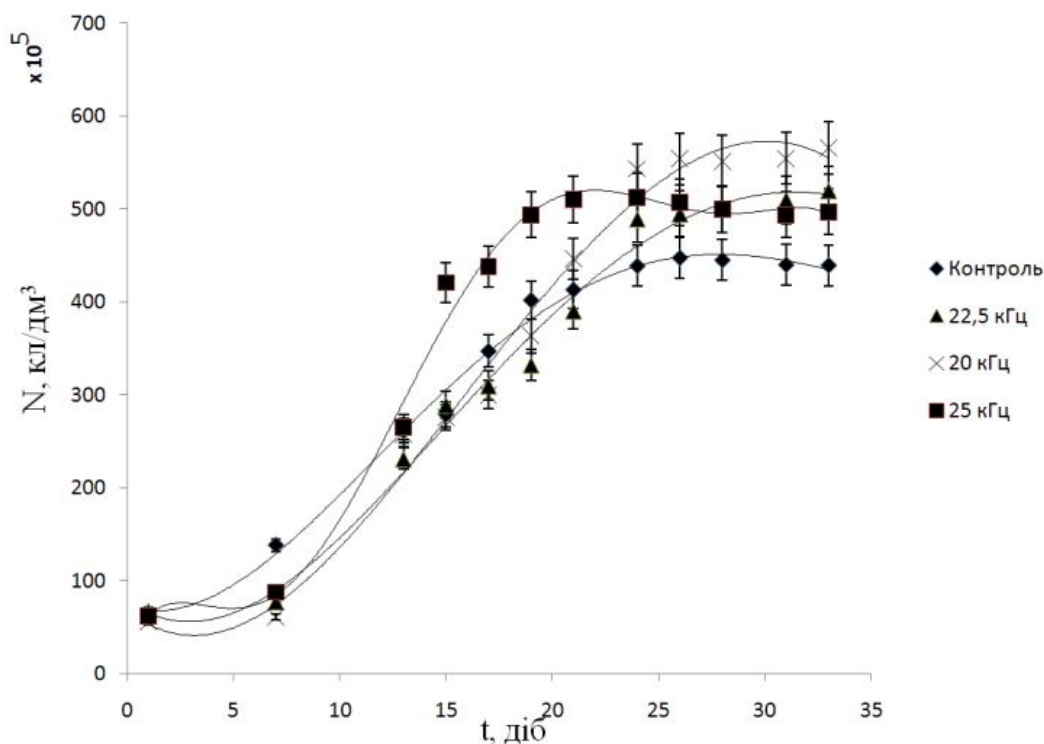


Рис. 1. Зміна приросту клітин (N) при дії ультразвуку частотами (кГц):
1 – контроль без дії ультразвуку; 2 – 20; 3 – 22,5; 4 – 25.

На відміну від дії більш низьких частот, при застосуванні опромінення частотою 25 кГц (рис. 1, крива 4) зменшується термін експонентної фази. В цьому випадку кількість біомаси, що утворюється в процесі розвитку культури, знижується, але перевищує приріст біомаси за стандартних умов. Це призводить до зниження швидкості фотосинтетичних процесів і, як наслідок, до зменшення енергетичних запасів клітини, що призводить до уповільнення процесів біосинтезу білків і розвитку клітин.

Узагальнені дані дії ультразвукового опромінення різної частоти на приріст біомаси наведено на рис. 2.

Як видно з рис. 2, максимальний приріст біомаси мікродоростей спостерігається при дії ультразвукового опромінення частотою 20 кГц. Підвищення приросту біомаси у 4,3 рази по відношенню до культивування мікродорості *Chlorella vulgaris* без впливу ультразвуку дозволяє використовувати ультразвукове опромінення частотою 20 кГц для інтенсифікації процесу культивування мікродоростей у промислових

масштабах. Дія опромінення частотою 22,5 і 25 кГц також приводить до підвищеного приросту біомаси мікродоростей порівняно з контролем. Але дія таких частот призводить до зменшення тривалості експонентної фази росту, порушення обміну речовин, що уповільнює швидкість метаболізму клітин і продукування біомаси.

Таблиця 1. Зміна приросту біомаси *Chlorella vulgaris* за оптичною густиною при дії ультразвукового опромінення

Доба	Оптична густина			
	Контроль	20 кГц	22,5 кГц	25 кГц
1	0,025	0,14	0,05	0,025
3	0,05	0,25	0,09	0,029
5	0,055	0,445	0,14	0,03
8	0,073	0,75	0,35	0,048
10	0,075	0,85	0,36	0,049
12	0,075	0,95	0,37	0,05
15	0,08	1	0,36	0,058
17	0,09	1	0,36	0,069

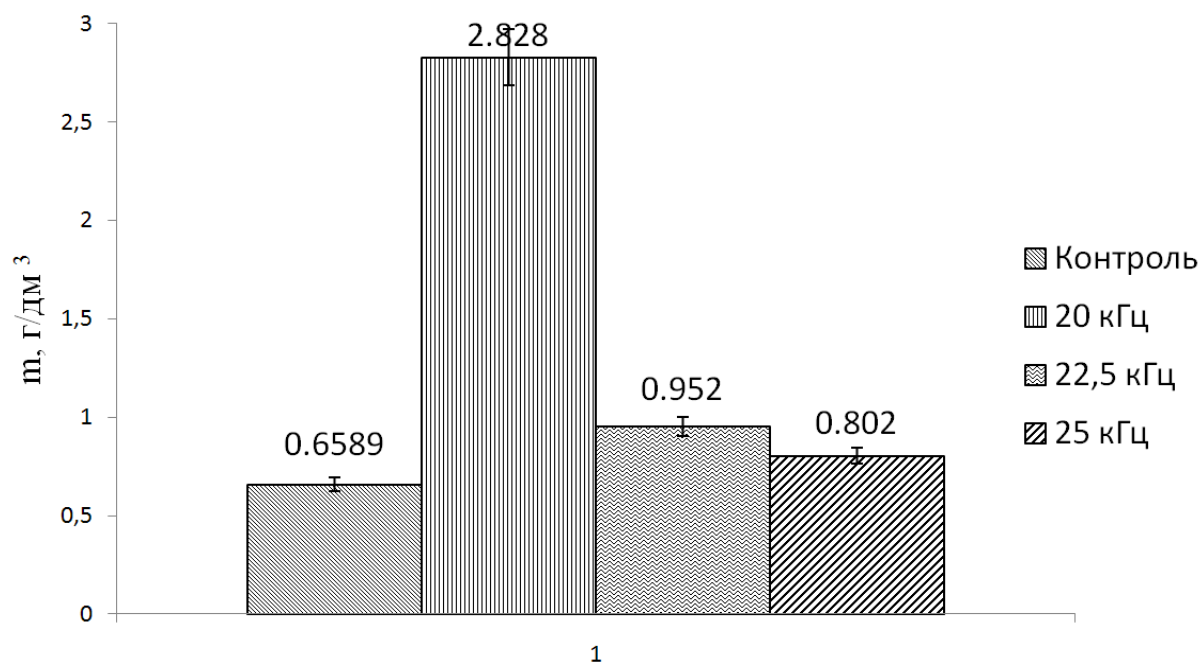


Рис. 2. Приріст біомаси мікродоростей (m) *Chlorella vulgaris* за 30 днів культивування при дії ультразвукового опромінення різної частоти.

Зміну маси ліпідної фракції *Chlorella vulgaris* в залежності від дії ультразвукового опромінення різної частоти за 30 діб культивування наведено на рис. 3. Найвищу кількість ліпідів за період культивування одержано за використання дії ультразвукового опромінення частотою 20 кГц.

Питомий вміст ліпідів у сухій біомасі за 30 діб культивування (рис. 4) складає: у контрольному досліді – 13,81%; при дії ультразвукового опромінення частотою 20 кГц – 55,67%; при дії ультразвукового опромінення частотою 22,5 кГц – 80,46%; при дії ультразвукового опромінення частотою 25 кГц – 31,92%.

Високий вміст ліпідів у клітинах при вирощуванні під дією ультразвукового опромінення можна пояснити впливом стресового фактора,

який приводить до накопичення багатих на енергію сполук (ліпідів). Хоча питомий вміст ліпідів при дії ультразвукового опромінення 22,5 кГц значно більший (рис. 4), загальний вихід ліпідів більший при дії 20 кГц (рис. 3) завдяки більшому приросту біомаси (рис. 2). Менший вміст ліпідів при дії опромінення частотою 25 кГц пов'язаний з уповільненням процесів біосинтезу і направленням метаболічних процесів на знешкодження руйнуючої дії опромінення, наприклад, репарацію ДНК та відновлення структури мембран. У той же час, дія опромінення вищої частоти призводить до загибелі частини клітин; при цьому кількість ліпідів у них залишається на притаманному для розвитку *Chlorella vulgaris* рівні, що приводить до загального зменшення питомої концентрації ліпідів.

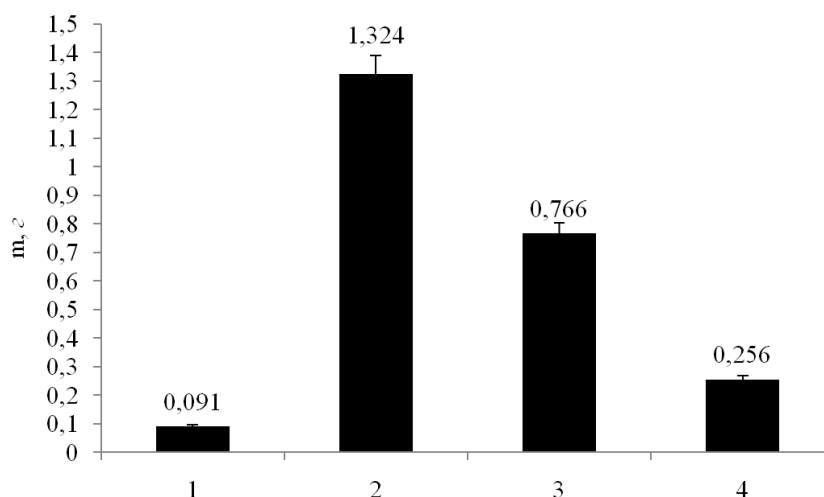


Рис. 3. Продуктування ліпідної фракції (*m*) *Chlorella vulgaris* в залежності від дії ультразвукового опромінення частотою (кГц): 1 – контроль; 2 – 20; 3 – 22,5; 4 – 25.

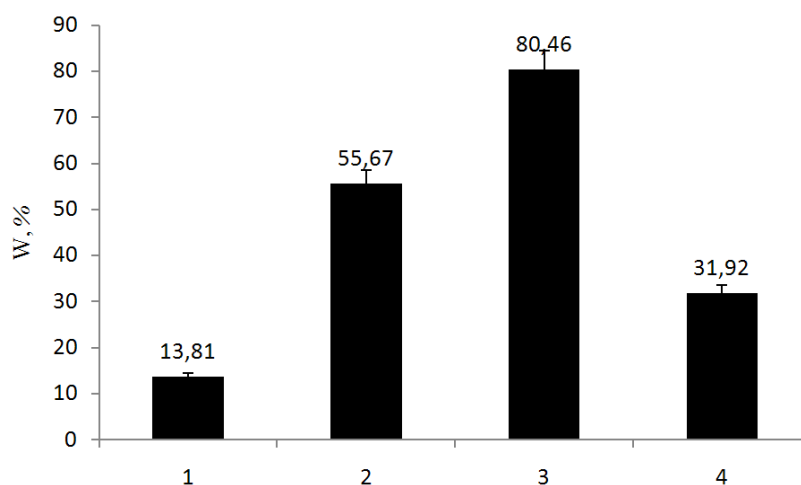


Рис. 4. Масова частка ліпідної фракції (*W*) *Chlorella vulgaris* в залежності від дії ультразвукового опромінення частотою (кГц): 1 – контроль; 2 – 20; 3 – 22,5; 4 – 25.

Таким чином, дія ультразвукового опромінення частотою 20 кГц є тим стресовим фактором, який приводить як до підвищення приросту біомаси, так і до продукування клітинами *Chlorella vulgaris* ліпідної фракції – сировини для одержання біодизельного палива. Досягнення концентрації ліпідів у 55% в клітинах розповсюдженої у природі мікроводорості є підґрунтям для створення технології одержання біодизельного палива з мікроводоростей.

Висновки. 1. Використання ультразвукового опромінення низької частоти приводить до інтенсифікації біосинтетичних процесів і підвищення приросту біомаси *Chlorella vulgaris*. Приріст біомаси збільшується в 4 рази у порівнянні з контрольним зразком при дії ультразвуку частотою 20 кГц.

2. Найбільший питомий вміст ліпідної фракції (до 80%) спостерігається при дії ультразвуковим опроміненням частотою 22,5 кГц. За дії опромінення частотою 20 кГц питомий вміст ліпідів складає 55%.

3. Одержані результати є підґрунтям для створення технології одержання біодизельного палива за використання мікроводорості *Chlorella vulgaris*.

1. Кудря С.О. Нетрадиційні відновлювані джерела енергії: [підруч.] / Кудря С.О. – К.: НТУУ "КПІ", 2012. – 492 с. ISBN 978-966-622-521-7.

2. Harwood J.L. Lipid Metabolism in Algae. In Advances in Botanical Research / J.A. Callow. // Academic

Press: Waltham, MA, USA. – 1989. – Vol. 16. – P. 1–53.

3. Золотарьова О.К. Перспектив використання мікроводоростей у біотехнології / О.К. Золотарьова, Г.І. Шнюкова, О.О. Сиваш, Н.Ф. Михайленко; під ред. О.К. Золотарьової – К.: Альтерпрес, 2008. – 235 с.

4. Chisti Y. Biodiesel from microalgae / Y. Chisti // Biotechnology Advances – 2007. – 25 (3) – P. 294–306.

5. Schenk P.M. Second generation biofuels: High-efficiency microalgae for biodiesel production / P.M. Schenk, S.R. Thomas-Hall, E. Stephens, U. Marx, J. Mussgnug, C. Posten, O. Kruse, B. Hankamer // BioEnergy Res. – 2008. – 1. – P. 20–43.

6. Brennan L. Biofuels from microalgae: A review of technologies for production, processing, and extraction of biofuels and co-products. / L. Brennan, P. Owende // Renew. Sustain. Energy Rev. 2010. – Vol. 14. – P. 557–577.

7. Xin-Guang Zhu. What is the maximum efficiency with which photosynthesis can convert solar energy into biomass? / Xin-Guang Zhu, P. Long, Stephen, D. R. Ort. // Current opinion in biotechnology. – 2008. – Vol. 19. – P. 153–159.

8. Kyle D.J. Production and use of lipids from microalgae / D.J. Kyle // Lipid Technol. – 1992. – 4, №3. – P. 59–64.

9. Rodolfi L. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor / L. Rodolfi, G. Chini Zittelli, N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini, M.R. Tredici // Biotechnol. Bioeng. – 2009. – Vol. 102. – P. 100–112.

10. Becker E.W. Microalgae: biotechnology and microbiology / E. W. Becker. – Cambridge University Press, 1994. – 301 p. – ISBN 0521350204.

11. Chinnasamy S. Biomass Production Potential of a Wastewater Alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under Elevated Levels of CO₂ and Temperature / Chinnasamy, B. Ramakrishnan, A. Bhatnagar, K.C. Das // Int. J. Of Molecular Sciences, 2009, vol. 10. – P. 518–532.

12. ГОСТ 8756.21-89 Продукты переработки плодов и овощей. Методы определения жира – Введ. 01.07.1990. – М.: ИПК Издательство стандартов, 1990. – 6 с.