

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Некоммерческое акционерное общество «Казахский национальный исследовательский  
технический университет имени К.И.Сатпаева»

Горно-металлургический институт имени О.А. Байконурова  
Кафедра Химических процессов и промышленной экологии

Оразғалиев Әлімжан Серікқалиұлы

Выделение липидов из микроводорослей для производства биодизельного топлива

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

7M05202 Биоэкологическая инженерия

Алматы 2025

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ  
КАЗАХСТАН

Некоммерческое акционерное общество «Казахский национальный  
исследовательский технический университет имени К.И.Сатпаева»

Горно-металлургический институт имени О.А. Байконурова  
(наименование института)

УДК 665.622.43.046.6-52 (043)

На правах рукописи

Оразгалиев Әлімжан Серікқалиұлы

(Ф.И.О. обучающегося)

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ (ПРОЕКТ)**

На соискание академической степени магистра

Название диссертации Выделение липидов из микроводорослей для произв-  
биодизельного топлива.  
Направление подготовки 7M05202 Биозкологическая инженерия  
(шифр и наименование образовательной программы)

Научный руководитель

д.б.н., профессор  
(ученая степень, звание)

  
подпись Еликбаев Б.К.  
Ф.И.О.

«13» 06 20 25 г.

Рецензент:  
Декан факультета биологии и  
биотехнологии КазНУ им.аль-Фараби,

д.б.н., профессор  
Курманбаева М.С.

«13» 06 20 25 г.

Норм. контроль  
д.б.н., профессор  
(ученая степень, звание)

  
подпись Еликбаев Б.К.  
Ф.И.О.

«13» 06 20 25 г.

ДОПУЩЕН К ЗАЩИТЕ  
НАО «КазНУ им.К.И.Сатпаева»  
Горно-металлургический институт  
им. О.А. Байконурова

ДОПУЩЕН К ЗАЩИТЕ

Заведующий кафедрой

к.т.н., ассоциированный профессор  
(ученая степень, звание)

  
подпись Кубекова Ш.Н.  
Ф.И.О.

«13» 06 20 25 г.

Алматы 2025

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

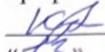
Некоммерческое акционерное общество «Казахский национальный исследовательский  
технический университет имени К.И.Сатпаева»

Горно-металлургический институт имени О.А. Байконурова  
Кафедра Химических процессов и промышленной экологии

7M05202 Биоэкологическая инженерия

**УТВЕРЖДАЮ**

Заведующий кафедрой  
Химических процессов и  
промышленной экологии,  
к.т.н., ассоциированный  
профессор

 Кубекова Ш.Н.  
« 12 » 06 20 25 г.

**ЗАДАНИЕ**

**на выполнение магистерской диссертации**

Магистранту Оразғалиев Әлімжан Серікқалиұлы

Тема: «Выделение липидов из микроводорослей для производства биодизельного  
топлива»

Утверждена приказом Член Правления-Проректор по академическим вопросам Жаутиков  
Б. № 548 П/Ө от 04.12.2023 г.

Срок сдачи законченной диссертации « 12 » 06 20 25 г.

Исходные данные к магистерской диссертации:

Перечень подлежащих разработке в магистерской диссертации вопросов:

- 1) Теоретическое изучение методов получения биодизеля.
- 2) Поиск и выделение перспективных штаммов микроводорослей. Скрининг активных штаммов микроводорослей по продуктивности
- 3) Выделение активных культур микроводорослей-продуцентов липидов для производства биодизеля. Определение содержания липидов в выделенных штаммах микроводорослей

**ГРАФИК  
подготовки магистерской диссертации**

Наименование разделов, перечень разрабатываемых вопросов	Сроки представления научному руководителю	Примечание
Теоретическое изучение методов получения биодизеля.	Июнь 2024	<i>выполнено</i>
Поиск и выделение перспективных штаммов микроводорослей. Скрининг активных штаммов микроводорослей по продуктивности	Декабрь 2024	<i>выполнено</i>
Выделение активных культур микроводорослей-продуцентов липидов для производства биодизеля. Определение содержания липидов в выделенных штаммах микроводорослей	Май 2025	<i>выполнено</i>

**Подписи**

консультантов и нормоконтролера на законченную магистерскую диссертацию с указанием относящихся к ним разделов диссертации

Наименование разделов	Консультанты, ФИО. (уч. Степень, звание)	Дата подписания	Подпись
Нормоконтролер	д.б.н., профессор, Еликбаев Б.К.	<i>12.06.2025</i>	

Научный руководитель

  
(подпись) Еликбаев Б.К.  
ФИО

Задание принял к исполнению обучающийся

  
(подпись) Оразгалиев Э.С.  
ФИО

Дата

« 12 » 06 2025 г.

## ABSTRACT

The volume of the thesis is 60 pages, 13 pictures, 3 tables, 56 sources, 0 appendices. MICROALGAE, BIODIESEL PRODUCTION, LIPID EXTRACTION

Purpose of the work: isolation and study of potential algae strains for further biodiesel production

Tasks:

1. Search and isolation of promising microalgae strains
2. Screening of active microalgae strains by productivity
3. Isolation of active cultures of microalgae producing lipids for biodiesel production
4. Determination of lipid content in isolated microalgae strains

The object - Microalgae strains isolated from thermal springs in Chunja.

The subject - the search and isolation of promising algae strains for the production of lipids.

The fuel produced on the basis of microalgae is an absolutely renewable energy resource and represents a comparable alternative to traditional hydrocarbon analogues. Biodiesel, based on photosynthesis of algae growing on CO<sub>2</sub>, has great potential as a biofuel.

To create a technology for the production of biodiesel from microalgae, it is necessary to consider such aspects as choosing the most productive strain, like *Chlorella sp.* It is essential to control the cultivation conditions. Maximum extraction of lipids requires careful work and correct execution of the Soxhlet apparatus procedure.

Results:

- From Chundzha thermal spring seven samples of water were collected and culture was further obtained.
- 2 species of microalgae were purified algaecologically and bacteriologically. Then, cultivated in photobioreactor.
- The dried biomass of the microalga was extracted to isolate the lipid fraction. The quantitative determination of the lipid components of the microalga was carried out by the extraction method in a Soxhlet apparatus.

## АННОТАЦИЯ

Объем дипломной работы 60 страниц, 13 рисунков, 3 таблиц, 56 источников, 0 приложений.

### МИКРОВОДОРОСЛИ, ПРОИЗВОДСТВО БИОДИЗЕЛЬНОГО ТОПЛИВА, ВЫДЕЛЕНИЕ ЛИПИДОВ

Цель: выделение и изучение потенциальных штаммов водорослей для дальнейшего производства биодизеля

Задачи:

1. Поиск и выделение перспективных штаммов микроводорослей
2. Скрининг активных штаммов микроводорослей по продуктивности
3. Выделение активных культур микроводорослей-продуцентов липидов для производства биодизеля
4. Определение содержания липидов в выделенных штаммах микроводорослей

Объект – Штаммы микроводорослей, выделенные из термальных источников в Чундже.

Предмет – Поиск и выделение перспективных штаммов водорослей для получения липидов.

Биотопливо, производимое из микроводорослей, относится к полностью возобновляемым источникам энергии и может стать полноценной заменой ископаемым углеводородам. Биодизельное топливо, основанное на фотосинтезе водорослей, растущих на CO<sub>2</sub>, имеет большой потенциал в качестве биотоплива.

Для создания технологии производства биодизельного топлива из микроводорослей необходимо учитывать такие аспекты, как выбор наиболее продуктивного штамма, такого как *Chlorella sp.* Очень важно контролировать условия выращивания. Максимальное извлечение липидов требует тщательной работы и правильного выполнения процедуры аппарата Сокслета.

Результаты:

- Из термального источника Чунджа было взято семь проб воды, и в дальнейшем была получена культура.
- 2 вида микроводорослей были очищены альгалигически и бактериологически. Затем культивировались в фотобиореакторе.
- Высушенную биомассу микроводоросли экстрагировали для выделения липидной фракции. Количественное определение липидных компонентов микроводоросли проводили методом экстракции в аппарате Сокслета.

## АҢДАТПА

Дипломдық жұмыстың көлемі 60 бет, 13 сурет, 3 кесте, 56 дереккөз, 0 қосымша.

### МИКРОБАЛДЫРЛАР, БИОДИЗЕЛЬ ОТЫНЫН ӨНДІРУ, ЛИПИДТЕРДІ БӨЛУ

Мақсаты: биодизельді өндіру үшін балдырлардың ықтимал штамдарын оқшаулау және зерттеу.

Міндеттері:

1. Микробалдырлардың перспективалы штамдарын іздеу және оқшаулау
2. Микробалдырлардың белсенді штамдарының өнімділігі бойынша скринингі
3. Биодизель өндіру үшін липид өндіретін микробалдырлардың белсенді дақылдарын оқшаулау
4. Микробалдырлардың оқшауланған штамдарындағы липидтердің құрамын анықтау

Объект - Чунджадағы ыстық бұлақ көздерінен алынған микробалдырлардың штамдары.

Тақырып - липидтер алу үшін балдырлардың перспективті штамдарын іздеу және оқшаулау.

Микробалдырлар негізінде алынатын отын сарқылмайтын энергетикалық ресурс және дәстүрлі көмірсутекті аналогтарға салыстырмалы балама болып табылады. CO<sub>2</sub>-де өсетін балдырлардың фотосинтезіне негізделген биодизель отыны биоотын ретінде үлкен әлеуетке ие.

Микробалдырлардан биодизель өндіру технологиясын жасау үшін *Chlorella sp.* сияқты ең өнімді штамды таңдау секілді аспектілерді ескеру қажет. Өте маңызды шарттардың бірі – тұрақты бақылау. Липидтерді максималды мөлшерде шығару мұқият жұмыс істеуді және Сокслет аппаратының процедурасын дұрыс орындауды талап етеді.

Нәтижелері:

- Чунджа ыстық бұлақ көзінен жеті су сынамасы, содан кейін өсіндісі алынды.
- Микробалдырлардың 2 түрі альгологиялық және бактериологиялық тұрғыдан тазартылып, фотобиореакторда өсірілді.
- Липидті фракцияны оқшаулау үшін микробалдырлардың кептірілген биомассасы алынды. Микробалдырлардың липидті компоненттерін сандық анықтау Сокслет аппаратында экстракция әдісімен жүргізілді.

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение	9
1 Обзор литературы	13
1.1 Микроскопические водоросли как перспективный источник возобновляемой биомассы	11
1.2 Критерии поиска и отбора перспективных штаммов микроводорослей для производства липидов	15
1.3 Сбор полевых образцов для получения культур микроводорослей	17
1.4 Факторы развития микроводорослей	19
1.5 Современные методы генетической модификации микроводорослей	20
1.6 Микроводоросль <i>Chlorella</i> и её характеристики	22
1.7 Перспективы использования биомассы <i>Chlorella</i> для производства биодизеля	23
1.8 Условия и фотобиореакторы для культивирования <i>Chlorella</i>	24
1.9 Экономические и экологические аспекты производства биодизеля из микроводорослей	27
1.10 Мировые проекты по промышленному выращиванию хлореллы	30
1.11 Альтернативные направления использования биомассы хлореллы.	32
2 Материалы и методы исследования	
2.1 Материалы исследования	34
2.2 Сбор полевых образцов	35
2.3 Лабораторное культивирование микроводорослей	36
2.4 Методы культивирования микроводорослей на жидких и агаризованных средах	37
2.5 Выращивание <i>Chlorella vulgaris</i> (Н-1) и <i>Chlorella</i> sp. (СН-2)	41
2.6 Моделирование и обоснование выбора формы фотобиореактора для культивирования образцов микроводорослей	42
2.7 Количественное определение общей фракции липидов методом экстракции Сокслета	44
3 Результаты и обсуждение	
3.1 Разнообразие видов микроводорослей в обогащенной культуре	46

3.2	Посев образцов на различные питательные среды	47
3.3	Получение водорослей, логически чистых микроводорослей	48
3.4	Получение биологически чистых микроводорослей.	49
3.5	Скрининг продуктивности микроводорослей	50
3.6	Расчет содержания липидов в образцах микроводорослей	53
3.7	Сравнение содержания липидов в <i>Chlorella vulgaris</i> (СН-1) и <i>Chlorella sp.</i> (СН-2)	53
	Заключение	55
	Список использованной литературы	57

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность.** В связи с недавним ростом мирового энергопотребления и ограниченными запасами природного минерального сырья интерес к альтернативным источникам энергии значительно возрос. Микроводоросли могут стать отличной альтернативой, поскольку обладают высокой скоростью размножения и способностью накапливать значительное количество высокоэнергетических липидов благодаря своей высокой фотосинтетической активности. Энергетическая ценность сырой нефти, полученной из водорослей, составляет около 35 800 кДж/кг, что соответствует примерно 80% средней энергетической ценности обычной нефти. Это позволяет рассматривать их как замену нефти для производства жидкого топлива, аналогичного современному транспортному топливу.

В настоящее время микроводоросли таких родов, как *Chlorella*, *Dunaliella*, *Nannochloropsis*, *Scenedesmus* и *Spirulina*, активно применяются в промышленных масштабах для получения биомассы и её производных. Согласно данным [1], ежегодный объём выращивания *Chlorella* в мире составляет более 2000 тонн, а *Dunaliella* – свыше 1200 тонн.

Хотя микроводоросли рассматриваются как перспективный возобновляемый источник сырья, их использование для коммерческого производства биотоплива пока остаётся нерентабельным. Ключевым ограничением является низкий выход липидов у многих штаммов. Их накопление зависит как от генетических особенностей микроорганизма, так и от параметров культивирования, причём даже внутри одного вида содержание липидов может значительно колебаться. В связи с этим лишь отдельные штаммы микроводорослей пригодны для синтеза биодизельного топлива.

Отбор штаммов для производства биодизеля зависит от их стабильности в процессе культивирования, скорости накопления биомассы и содержания липидов. Таким образом, необходимо искать высокоэффективные штаммы, способные производить биомассу с высоким содержанием липидов, чтобы разработать метод получения качественного биодизеля.

Энергопотребление — основа существования человечества, и в мире наблюдается устойчивая тенденция к его росту. Сегодня энергия добывается главным образом из ископаемых видов топлива, запасы которых ограничены и считаются невозобновляемыми. Кроме того, продукты сгорания ископаемого топлива вызывают изменение климата и другие экологические проблемы. В отличие от них, топливо на основе микроводорослей — это полностью возобновляемый ресурс, представляющий собой эквивалентную альтернативу традиционным углеводородным аналогам.

Один из самых известных видов биотоплива — биодизель. Обычно его получают из масличных культур, таких как рапс, соя, подсолнечник и пальма. Однако для их выращивания требуются большие площади

сельскохозяйственных земель, где часто используются повышенные дозы химических средств защиты растений. Это приводит к деградации почв и снижению их качества.

Многие исследователи связывают выход из сложившейся ситуации с фототрофными микроорганизмами, поскольку они также синтезируют масла, которые могут стать сырьём для производства биодизеля.

Микроводоросли чрезвычайно перспективны для производства широкого спектра продуктов, включая биотопливо, белковые корма для животных и другие ценные вещества, благодаря возможности выращивания на непригодных для сельского хозяйства землях, а также способности очищать сточные и солёные воды.

Использование микроводорослей может стать устойчивой альтернативой, поскольку они являются наиболее эффективными биологическими продуцентами жирных кислот в мире, а также универсальным возобновляемым источником биомассы. Согласно прогнозам, вскоре эти организмы могут стать одними из важнейших культур для производства биотоплива. Биодизель на основе фотосинтеза водорослей, растущих за счёт поглощения CO<sub>2</sub>, обладает огромным потенциалом. Эти организмы следует рассматривать как альтернативу растительным маслам в производстве биодизеля.

Поиск новых активных штаммов микроводорослей из природных источников — это ключевая и наиболее эффективная на данный момент стратегия для получения штаммов, адаптированных к местным климатическим условиям и способных продуцировать целевые биотехнологические компоненты.

Широкое распространение фототрофных организмов в природе и их огромный метаболический потенциал, включая питательную ценность, определяют важное теоретическое и практическое значение этих объектов. В связи с этим актуально поиск штаммов микроводорослей, которые являются источником биомассы с высокой продуктивностью, низкими ресурсными и энергетическими затратами при выращивании и переработке, а также способны производить широкий спектр продуктов, включая липиды.

В современном мире множество технологий использования биомассы для сырьевых и энергетических целей находятся на стадии крупномасштабного внедрения или активной разработки. Поиск продуктивных видов биомассы для энергетики выводит фототрофные микроорганизмы в категорию перспективных источников. При разработке таких биотехнологических процессов важно учитывать не только возможность получения целевых продуктов, но и обеспечение экологической безопасности с минимальной нагрузкой на окружающую среду. Биомасса микроводорослей в максимальной степени соответствует этим требованиям.

Интерес к фототрофным микроорганизмам обусловлен их в 20 раз более высокой скоростью накопления биомассы по сравнению с традиционными

сельскохозяйственными культурами. Кроме того, для их выращивания не требуются пахотные земли.

Среди всех видов микроводорослей, используемых в массовом культивировании, наиболее распространённым является *Chlorella sp.* Её отличительная особенность — эффективное использование световой энергии и химический состав клетки (белки, витамины, незаменимые аминокислоты, микроэлементы, биологически активные вещества).

В данной работе рассматриваются перспективы комплексного использования биомассы микроводорослей *Chlorella vulgaris* (СН-1) и *Chlorella sp.* (СН-2) в качестве сырья для производства энергоносителей. Проведён обзор технологий культивирования микроводорослей с высоким содержанием липидов. Выполнены экспериментальные исследования режимов периодического культивирования данных штаммов.

**Научная новизна:** В работе выделены штаммы микроводорослей из природных источников вблизи села Чунджа, где расположены термальные источники. Изучена их морфология, а также способность продуцировать липиды, которые могут стать альтернативой традиционному топливу.

**Практическая значимость работы:** В ходе проведенного исследования были идентифицированы и селекционированы штаммы микроводорослей, демонстрирующие высокую продуктивность по накоплению насыщенных липидов при одновременном быстром росте биомассы. Эти перспективные штаммы представляют значительный интерес для биотехнологической отрасли, поскольку могут стать основой для разработки эффективных технологий производства биодизельного топлива. Фундаментальная ценность работы заключается в детальном исследовании метаболических механизмов липидогенеза у отобранных штаммов. Полученные данные выявляют видовые и штаммоспецифические особенности биосинтеза и накопления липидов в клетках микроводорослей. Эти результаты создают научную базу для дальнейших исследований по направленной модификации липидного метаболизма с применением современных методов генетической инженерии и метаболического инжиниринга.

**Анализ современного состояния проблемы:** Современные исследования показывают, что продуктивность микроводорослевой биомассы определяется комплексом взаимосвязанных факторов, включая условия культивирования, физиологию штаммов и технологические параметры процесса. Для достижения экономической целесообразности промышленного применения микроводорослей требуется углубленное изучение целого ряда аспектов.

Особый научный интерес представляют недостаточно изученные метаболические особенности различных штаммов, определяющие их липидпродуцирующую способность. Комплексное исследование физиолого-биохимических характеристик новых штаммов, их метаболических путей, а также разработка эффективных методов переработки биомассы открывают

новые перспективы для создания высокоэффективных технологий получения биотоплива второго поколения. Такие исследования особенно актуальны в контексте развития устойчивой биоэкономики и поиска альтернатив традиционным углеводородным ресурсам.

**Цель исследования:** выделить чистые культуры водорослей, изучить их культуру, морфологию и физиологические характеристики, а также отобрать изолированные культуры микроводорослей на основе продуктивности и содержания липидов.

**Методы исследования:** Микробиологические, биотехнологические и биохимические методы.

**Объекты исследования:** Вновь выделенные и коллекционные штаммы микроводорослей.

**Задачи исследования:**

1. Поиск и выделение перспективных штаммов микроводорослей
2. Скрининг активных штаммов микроводорослей по продуктивности
3. Выделение активных культур микроводорослей-продуцентов липидов для производства биодизеля
4. Определение содержания липидов в выделенных штаммах микроводорослей

**Объект исследования:** Вновь выделенные и коллекционные штаммы микроводорослей.

**Предмет исследования:** На основе анализа и наблюдений проводится поиск наиболее продуктивных культур микроводорослей с самым высоким содержанием липидов, выгодных методов их выращивания и выбора наилучшего метода извлечения из них липидов. Обосновать технологический процесс извлечения липидов из образцов микроводорослей. Определить закономерности выращивания образцов высокопродуктивных микроводорослей с учетом внешних факторов. Закономерности технологического процесса культивирования микроводоросли *Chlorella sp.*, извлечения из нее липидов для производства биодизельного топлива.

**Практическая база:** Работа выполнена на кафедре биотехнологии под руководством научного руководителя, к.б.н., доцента Болатхана К. и консультировал д.б.н., профессор Еликбаев Б.К.

## 1 Обзор литературы

### 1.1 Микроскопические водоросли как перспективный источник возобновляемой биомассы

Водоросли — это фотосинтезирующие организмы, обитающие в различных водных средах: озёрах, прудах, реках, океанах и даже сточных водах. Они способны адаптироваться к широкому диапазону температур, солёности, уровня рН, интенсивности освещения, а также к условиям водоёмов или пустынь. Водоросли могут расти как самостоятельно, так и в симбиозе с другими организмами [1]. Их классифицируют на *Rhodophyta* (красные водоросли), *Phaeophyta* (бурые водоросли) и *Chlorophyta* (зелёные водоросли), а по размеру — на макро- и микроводоросли. Макроводоросли (морские водоросли) — это многоклеточные организмы, видимые невооружённым глазом, тогда как микроводоросли представляют собой микроскопические одноклеточные организмы, которые могут быть прокариотами (например, цианобактерии *Chloroxybacteria*) или эукариотами (например, зелёные водоросли *Chlorophyta*) [2].

Микроводоросли отличаются огромным биоразнообразием: на сегодня описано и изучено около 50 000 видов [3]. Одним из наиболее известных эукариотических микроводорослей является *Chlorella vulgaris* (зелёная водоросль), которая относится к следующей научной классификации:

Домен: *Eukaryota*

Царство: *Protista*

Отдел: *Chlorophyta*

Класс: *Trebouxiophyceae*

Порядок: *Chlorellales*

Семейство: *Chlorellaceae*

Род: *Chlorella*

Вид: *Chlorella vulgaris*

Это первый фотосинтезирующий микроорганизм, который удалось выделить и культивировать в чистом виде. *C. vulgaris* — это сферическая одноклеточная эукариотическая водоросль, главной особенностью которой является толстая клеточная стенка (100–200 нм) [4]. Исследования подтверждают её устойчивость к химическому воздействию и тяжёлым металлам, что объясняет её широкое применение в очистке сточных вод [5].

Использование микроводорослей в качестве сырья для биотоплива обладает рядом существенных преимуществ, включая высокую энергоэффективность и относительно низкую себестоимость производства по сравнению с традиционными источниками биомассы. Биотопливо на основе микроводорослей относится к третьему поколению и требует значительно меньше энергозатрат при переработке, обеспечивая при этом высокую экономическую рентабельность. Одним из ключевых преимуществ микроводорослей является их исключительно высокая скорость роста, позволяющая получать биомассу круглогодично, а также повышенное содержание липидов в клетках — до 70%, что существенно превышает аналогичные показатели у традиционных маслических культур (например, у рапса этот показатель составляет около 30%) [6].

Благодаря этим уникальным свойствам микроводоросли рассматриваются как перспективное сырьё для производства биодизеля, биомасла и других видов экологически чистого топлива, способного заменить ископаемые углеводороды. Среди наиболее продуктивных видов микроводорослей, отличающихся высоким содержанием липидов, можно выделить *Chlorella sp.* (30–60%), *Neochloris oleoabundans* (25–44%), *Nannochloropsis sp.* (31–68%) и *Staphylococcus brucei* (25–85%) [7]. Важным преимуществом микроводорослей является их способность поглощать и накапливать солнечную энергию с КПД около 6%, тогда как у высших растений этот показатель не превышает 1% [8]. Эффективность фотосинтеза у микроводорослей зависит от множества факторов, включая географическое положение, генотип организма, температуру, интенсивность солнечного излучения и качество воды.

Исследования подтверждают, что микроводоросли способны продуцировать в 100 раз больше липидов по сравнению с другими фотосинтезирующими организмами [9]. Кроме того, их использование способствует сокращению выбросов парниковых газов, а высокая устойчивость к экстремальным условиям (колебаниям температуры, солёности, pH) делает процесс выращивания менее затратным. Важным экологическим преимуществом является отсутствие конкуренции с сельскохозяйственными угодьями, поскольку микроводоросли могут культивироваться в закрытых фотобиореакторах или открытых водоёмах, не пригодных для выращивания пищевых культур. Отдельного внимания заслуживает способность некоторых фотосинтезирующих микроорганизмов, включая цианобактерии, преобразовывать солнечную энергию непосредственно в молекулярный водород, который также рассматривается как перспективный вид биотоплива будущего [10].

Несмотря на значительный потенциал, широкомасштабное промышленное производство биотоплива из микроводорослей до сих пор сталкивается с рядом экономических и технологических ограничений. К основным проблемам относятся высокие затраты на воду, земельные ресурсы,

питательные вещества и электроэнергию, необходимые для поддержания оптимальных условий культивирования. Кроме того, себестоимость биодизеля из микроводорослей остаётся в 10 раз выше, чем у традиционного дизельного топлива [11], а процесс отделения биомассы от культуральной среды осложняется малым размером клеток и высокой влажностью суспензии [12].

Ключевыми задачами для успешной коммерциализации технологии являются поиск и селекция высокопродуктивных штаммов микроводорослей, оптимизация методов их культивирования, а также разработка экономически эффективных способов сбора, обезвоживания и переработки биомассы. Решение этих проблем позволит сделать производство биотоплива из микроводорослей конкурентоспособной альтернативой ископаемым энергоносителям.

## 1.2 Критерии поиска и отбора перспективных штаммов микроводорослей для производства липидов

Микроводоросли встречаются в пресноводных и морских экосистемах, а также в экстремальных условиях — например, в Антарктиде, солёных озёрах, горячих источниках и даже на заснеженных поверхностях при слабом освещении [13]. С развитием технологий производства биотоплива третьего поколения возрос интерес к выделению и изучению новых штаммов. На сегодня идентифицировано около 18 000 видов, а ещё 200 000 остаются неклассифицированными (преимущественно из отдела *Chlorophyta*) [14].

Накопленные данные о содержании липидов и сухой биомассе показывают, что наиболее перспективные виды содержат в среднем 20–50% масел (Таблица 1).

Таблица 1

Данные о содержании липидов (сухого вещества) в микроводорослях с высоким содержанием липидов [15]

Микроводоросли	Содержание масла (% по массе сухого вещества)
<i>Botryococcus braunii</i>	25–75
<i>Chlorella sp.</i>	28–32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16–37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis sp.</i>	25–33
<i>Monallanthus salina N</i>	20

<i>Nannochloris sp.</i>	20–35
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31–68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35–54
<i>Nitzschia sp.</i>	45–47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20–30
<i>Schizochytrium sp.</i>	50–77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15–23

Считается, что лучшие штаммы микроводорослей, пригодные для производства биотоплива, обладают рядом необходимых характеристик:

- высокая продуктивность биомассы и липидов (до 30–40%);
- выделение полезных побочных продуктов, которые могут быть использованы в дальнейшем производстве;
- оптимальный состав липидов;
- достижение высокой плотности клеток при культивировании в реакторе;
- устойчивость к вытеснению монокультуры другими микроорганизмами в открытых системах;
- способность эффективно поглощать углекислый газ;
- устойчивость к экстремальным сезонным температурам;
- короткий цикл производства [16].

Выделение микроводорослей из сопутствующей микрофлоры (других семейств микроводорослей, цианобактерий, бактерий и грибов) представляет значительную сложность. Как правило, микроводоросли невозможно отделить от микрофлоры, с которой они сожительствуют, из-за симбиотических взаимоотношений.

Для получения штаммов, пригодных для выращивания в промышленных масштабах, необходимо проводить их селекцию и поддерживать культуры заданных параметров, обладающие свойствами, не требующими присутствия сопутствующей микрофлоры или определённых компонентов питательной среды.

Для изоляции перспективных штаммов микроводорослей из природных смешанных культур применяют метод селективного культивирования на специально разработанных питательных средах. В исследовательской практике наибольшее распространение получили минимальные среды с точно сбалансированным составом макро- и микроэлементов, такие как Bold's Basal Medium (BBM), Среда Tamiya, Модифицированная среда F/2, Стандартная среда BG-11. Эти составы подбираются экспериментальным путем для создания оптимальных условий роста конкретных целевых видов микроводорослей, одновременно подавляя развитие сопутствующей микрофлоры. Принцип их действия основан на обеспечении необходимых питательных элементов для определенных таксономических групп и создании

селективного давления за счет специфического соотношения компонентов. Дополнительным преимуществом таких сред является их стандартизированный состав, что позволяет получать воспроизводимые результаты в разных лабораториях и сравнивать данные различных исследований [17].

### **1.3 Сбор полевых образцов для получения культур микроводорослей**

Наличие чистых культур является обязательным условием успешного физиологического, биохимического, цитологического и генетического изучения микроскопических водорослей. Метод лабораторного культивирования водорослей включает в себя комплекс операций, каждая из которых, в зависимости от целей и задач исследования, биологических и видовых особенностей культивируемого организма, а также условий работы, обладает значительной специфичностью [18].

В процессе культивирования водорослей условно можно выделить пять этапов:

1. Сбор полевых образцов воды или почвы в биотопе, где обитает интересующий исследователя организм.
2. Получение накопительной культуры организма. При сборе микроводорослей в период их интенсивной вегетации в природе (например, воды во время «цветения») накопительной культурой может служить сам природный образец, в котором целевой организм представлен в максимальном количестве.
3. Получение альгологически чистой культуры.
4. Получение бактериологически чистой культуры микроводорослей.
5. Выращивание микроводорослей в оптимальных или заданных условиях в зависимости от целей эксперимента. Сюда также относится интенсивное культивирование водорослей в контролируемых условиях для направленного биосинтеза [19].

Для успешного введения новых видов водорослей в культуру и их выращивания в лабораторных условиях необходимо соблюдение определенных требований:

- Строгое поддержание стерильности помещений, посуды и питательных сред, особенно на 3–6 этапах культивирования.
- Стерилизация посуды и сред в автоклавах (в исключительных случаях допускается сухая стерилизация посуды в сушильных шкафах) в соответствии с общепринятыми нормами.
- Обработка бокса перед работой:

- Питательную среду разливают, культуру пересаживают в специальный бокс, после чего его стерилизуют бактерицидной лампой (БУВ-40) в течение 20–30 минут.
- Посев проводят над пламенем газовой или спиртовой горелки, аналогично методам, применяемым в микробиологии.
- В случае отсутствия бокса допускается пересев альгологически чистых культур непосредственно в помещении над пламенем горелки или спиртовки (при этом необходимо исключить движение воздуха в комнате) [20].

#### 1.4 Факторы развития микроводорослей

Степень накопления биомассы и эффективность синтеза липидов являются ключевыми показателями пригодности штамма микроводорослей для использования в производстве биотоплива. Эти параметры зависят от множества условий, включая концентрацию и состав питательных веществ, температуру, уровень рН и освещенность. Регулирование параметров культивирования оказывает существенное влияние на качественный и количественный состав микроводорослевой биомассы. Экспериментальные данные свидетельствуют о значительных колебаниях в содержании и пропорциях биологически активных соединений (липидов, белков, углеводов) в зависимости от условий выращивания. Эти вариации имеют принципиальное значение при переходе от лабораторных исследований к промышленному производству, поскольку требуют тщательного контроля и оптимизации технологических параметров на каждом этапе масштабирования процесса.

Основными факторами роста являются температура, уровень рН и накопление липидов. Оптимальный температурный диапазон для наиболее распространенных видов (*Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus*) составляет 15–35 °С в зависимости от штамма [21]. Благоприятный диапазон рН для роста микроводорослей — 4.4–7.9 (зависит от штамма) [22]. Уровень рН культуральной среды оказывает комплексное влияние на процесс выращивания микроводорослей, воздействуя как на физиологию самих микроорганизмов, так и на доступность диоксида углерода, необходимого для их роста [23]. Процесс синтеза липидов активируется при стрессовых условиях, связанных с дефицитом питательных элементов (азота, фосфора, железа, серы). Многочисленные параметры, влияющие на накопление липидов и их состав, требуют индивидуальной оптимизации для каждого штамма в соответствии с его метаболическими особенностями [24].

Качественный и количественный состав макро- и микроэлементов также играет важную роль. Азот (N) существенно влияет на скорость роста, состав биомассы и содержание липидов. Повышение концентрации азота в среде приводит к увеличению содержания белка и хлорофилла, но снижает скорость

роста биомассы [25]. Фосфор (P) является ключевым компонентом клеточных мембран, нуклеиновых кислот и белков. Снижение его концентрации в среде вызывает значительное увеличение доли нейтральных липидов [26]. Железо (Fe) входит в состав ферментов, включая железосерные белки, участвующие в фотосинтезе. Для *Chlorella vulgaris* показано, что добавление соединений  $Fe^{3+}$  на поздней экспоненциальной фазе роста повышает содержание липидов в 3–7 раз [27].

Оптимальное соотношение элементов C/N/P, их ионные формы, содержание металлов в среде и уровень солености — ключевые факторы, определяющие активность фотосинтеза, скорость роста биомассы и её биохимический состав. Подбор оптимальных условий культивирования является критически важным для максимизации продуктивности штаммов по биомассе и липидам.

## 1.5 Современные методы генетической модификации микроводорослей

Современные биотехнологии всё чаще обращаются к генетической модификации микроводорослей как к мощному инструменту повышения их продуктивности и коммерческой ценности. Особый интерес в этом контексте представляет род *Chlorella*, представители которого демонстрируют значительный потенциал для производства биотоплива, но чья естественная метаболическая активность часто не соответствует промышленным требованиям. Последние достижения в области молекулярной биологии и геномной инженерии открыли новые перспективы для целенаправленного улучшения ключевых характеристик этих микроорганизмов, включая скорость роста, устойчивость к стрессовым факторам и способность к накоплению целевых метаболитов, таких как липиды для биодизельного производства.

В арсенале современных исследователей находится несколько высокоэффективных методов генетического редактирования, среди которых особого внимания заслуживает система CRISPR/Cas9. Эта революционная технология позволяет осуществлять точные направленные изменения в геноме микроводорослей, обеспечивая при этом высокую специфичность воздействия и минимальное количество побочных мутаций. В отличие от традиционных подходов, таких как случайный мутагенез или использование агробактериальных векторов, CRISPR/Cas9 демонстрирует беспрецедентную точность редактирования и широкую применимость к различным видам микроводорослей. Альтернативные методы, включая TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) и ZFN (Zinc Finger Nucleases), хотя и уступают CRISPR-системе в универсальности, продолжают находить применение в случаях, требующих особого подхода к сложным геномным

структурам. Особняком стоит метод гомологичной рекомбинации, позволяющий производить масштабные замены целых генов или их значительных фрагментов[28].

Практическое применение этих технологий уже принесло впечатляющие результаты в модификации штаммов *Chlorella*. Так, целенаправленное отключение гена *accD*, ответственного за кодирование субъединицы ацетил-КоА-карбоксилазы, позволило увеличить содержание липидов в клетках на 30-40%, что было подтверждено исследованиями Chen и его коллег в 2022 году. Не менее значимым достижением стало введение гена DGAT (диацилглицерол-ацилтрансферазы), заимствованного у других видов водорослей, что привело к существенному усилению синтеза триацилглицеридов - ключевого компонента при производстве биодизеля. Особого внимания заслуживают успехи в модификации фотосинтетического аппарата *Chlorella*, где усиление экспрессии генов светособирающего комплекса (ЛНС) позволило значительно улучшить показатели роста культуры в условиях пониженной освещённости.

Несмотря на очевидные успехи, широкомасштабное внедрение генетически модифицированных штаммов микроводорослей в промышленное производство сталкивается с рядом существенных препятствий. Регуляторные барьеры во многих странах требуют прохождения сложных и длительных процедур одобрения для использования ГМ-организмов, что существенно замедляет процесс коммерциализации. Вопросы биобезопасности, в частности потенциальный риск горизонтального переноса генов в природные популяции, продолжают оставаться предметом активных научных дискуссий. Технологические сложности, связанные с трансформацией некоторых штаммов *Chlorella*, также требуют дальнейших исследований и методических усовершенствований.

Перспективы развития этого направления связываются с прогрессом в области синтетической биологии и появлением новых инструментов генетического редактирования, таких как технология базового редактирования (Base Editing). Эти разработки открывают возможности для создания более безопасных и эффективных модификаций генома микроводорослей. Отраслевые эксперты прогнозируют, что в ближайшие годы мы станем свидетелями появления коммерчески доступных ГМ-штаммов, специально оптимизированных для крупномасштабного производства биотоплива и других ценных продуктов.

Генетическая инженерия микроводорослей, особенно с применением CRISPR/Cas9-систем, представляет собой мощный инструмент повышения их биотехнологического потенциала. Дальнейшие исследования в этой области должны быть сосредоточены на оптимизации методов генетической трансформации, минимизации потенциальных рисков и разработке эффективных стратегий интеграции генетически модифицированных штаммов в существующие производственные цепочки.

Особое значение приобретают междисциплинарные исследования, сочетающие достижения молекулярной биологии, биоинформатики и промышленной биотехнологии, которые могут привести к прорыву в коммерческом использовании микроводорослей[29].

## 1.6 Микроводоросль *Chlorella* и её характеристики

*Chlorella* представляет собой микроскопическую одноклеточную водоросль сферической формы, диаметр которой варьируется от 2 до 10 мкм. Эта фотосинтезирующая водоросль содержит в своих пластидах хлорофиллы \*a\* и \*b\*, которые играют ключевую роль в поглощении солнечной энергии и её преобразовании в органические вещества в процессе фотосинтеза [30].

Строение клетки и жизненный цикл. *Chlorella* является автотрофным организмом, у которого одна клетка выполняет все жизненно важные функции. Для её роста и развития необходимы вода, минеральные вещества, углекислый газ (CO<sub>2</sub>) и кислород. Эта водоросль широко распространена в природе: её можно обнаружить в пресных водоёмах, влажной почве, на коре деревьев и в других местах с достаточной влажностью. В отличие от другого распространённого рода микроводорослей — *Chlamydomonas*, *Chlorella* не имеет жгутиков, глазков и сократительных вакуолей. Её клетка содержит чашевидный хлоропласт (который может иметь или не иметь пиреноид — структуру, участвующую в накоплении крахмала), а также одно небольшое ядро.

Размножение *Chlorella* происходит исключительно бесполом путём — посредством митотического деления. Одна гаплоидная клетка делится 2–3 раза, образуя от 4 до 8 автоспор, которые остаются внутри материнской клетки до момента её разрыва. Скорость размножения *Chlorella* чрезвычайно высока: в оптимальных условиях её биомасса может увеличиваться в 10 раз быстрее, чем у высших растений, что делает её перспективным объектом для биотехнологического применения.

Химический состав. Сухая биомасса *Chlorella* отличается богатым химическим составом, что обуславливает её ценность для различных областей биотехнологии. В её состав входят:

- Белки (более 40%), включая все незаменимые аминокислоты, что делает её ценным источником протеина;
- Углеводы (33–35%), преимущественно в виде крахмала;
- Липиды (8–11%), содержание которых может значительно увеличиваться при определённых условиях культивирования [31].

*Chlorella* отличается высокой экологической пластичностью: она нетребовательна к условиям обитания и способна к интенсивному размножению в самых разных средах. Благодаря этим свойствам она широко

распространена в природе и легко адаптируется к изменяющимся условиям окружающей среды.

*Chlorella* представляет собой уникальный микроорганизм, сочетающий в себе высокую скорость роста, богатый биохимический состав и способность существовать в различных экологических нишах. Эти характеристики делают её перспективным объектом для использования в биотехнологии, включая производство биотоплива, пищевых добавок и других ценных продуктов.

### **1.7 Перспективы использования биомассы *Chlorella* для производства биодизеля**

Липидный состав клеток *Chlorella* отличается высокой вариабельностью и существенно зависит от условий культивирования, таких как освещённость, температура и состав питательной среды. Как и у высших растений, в клетках этой микроводоросли присутствуют два основных класса липидов: полярные и нейтральные, каждый из которых выполняет специфические биологические функции.

Полярные липиды, включая фосфолипиды и гликолипиды, преобладают в клетках при оптимальных условиях роста. Эти соединения являются важными структурными компонентами клеточных мембран (цитоплазматических, митохондриальных и тилакоидных), обеспечивая их избирательную проницаемость и участвуя в работе дыхательной цепи и фотосинтетического аппарата [32]. В отличие от них, нейтральные липиды, главным образом триацилглицериды (ТАГ), интенсивно накапливаются в условиях стресса, вызванного дефицитом азота, фосфора или других ключевых элементов. В таких случаях ТАГ формируют характерные липидные капли в цитоплазме, которые служат основным энергетическим резервом клетки. Именно эти нейтральные липиды представляют особый интерес для биотопливной промышленности, так как являются оптимальным сырьём для производства биодизеля [33].

Преимущества *Chlorella* как возобновляемого сырья. *Chlorella* обладает рядом уникальных свойств, делающих её исключительно перспективным объектом для биотехнологического использования:

1. Высокая эффективность фотосинтеза (КПД 3–8% против 0,5% у наземных растений) позволяет достигать рекордных показателей продуктивности на единицу площади [34].
2. Способность к активной утилизации CO<sub>2</sub> способствует снижению выбросов парниковых газов и может использоваться в системах биологической фиксации углерода.
3. Нетребовательность к качеству воды — может успешно культивироваться в сточных, солёных и даже загрязнённых водах, одновременно выполняя функцию их биологической очистки за счёт утилизации соединений азота и фосфора.

4. Возможность использования непродуктивных земель (пустыни, засоленные почвы) делает её выращивание экономически выгодным и не конкурирующим с традиционным сельским хозяйством.
5. Круглогодичное производство независимо от сезонных факторов.
6. Отсутствие необходимости применения пестицидов и минеральных удобрений значительно повышает экологичность производства.
7. Многоцелевое использование биомассы:
  - Белки и полисахариды — для производства кормов и пищевых добавок;
  - Пигменты (хлорофилл, каротиноиды) — в фармацевтической и пищевой промышленности;
  - Биополимеры — для создания биоразлагаемых материалов [35].

Энергетические характеристики. С точки зрения энергетической эффективности биомасса *Chlorella* обладает рядом преимуществ:

1. Высокая теплотворная способность, сравнимая с традиционными видами биотоплива;
2. Низкие показатели вязкости и плотности, облегчающие процессы переработки;
3. Повышенное содержание топливных липидов (до 70% от сухой массы при оптимизации условий культивирования).

Энергетический выход с единицы площади при культивировании *Chlorella* может в десятки раз превышать аналогичные показатели для традиционных масличных культур. Кроме того, технология выращивания отличается относительной простотой и хорошей масштабируемостью, что важно для промышленного внедрения [36].

*Chlorella* представляет собой уникальный возобновляемый ресурс, сочетающий высокую продуктивность, экологичность и многофункциональность использования. Её потенциал для устойчивого производства биотоплива и других ценных биопродуктов продолжает активно изучаться, открывая новые перспективы для зелёной экономики. Дальнейшие исследования должны быть направлены на оптимизацию технологий культивирования, снижение себестоимости производства и разработку эффективных методов переработки биомассы.

## **1.8 Условия и фотобиореакторы для культивирования *Chlorella***

Биопродуктивность микроводорослей, в частности *Chlorella*, определяется комплексом взаимосвязанных факторов культивирования, требующих тщательного контроля и оптимизации. К ключевым параметрам, влияющим на рост и биохимический состав биомассы, относятся: состав

питательной среды, концентрация CO<sub>2</sub>, уровень pH, температурный режим, условия освещения и конструкция фотобиореактора [37]. Каждый из этих факторов оказывает специфическое воздействие на метаболические процессы в клетках, что необходимо учитывать при разработке технологий промышленного культивирования.

Питательные среды и биохимический состав биомассы. Для культивирования *Chlorella* применяют различные стандартные и модифицированные питательные среды, включая Tamiya, Prat, Veneke, Knop и другие. Эти среды содержат сбалансированный комплекс макро- и микроэлементов (N, P, K, Mg, S, Ca, Na, Fe, Mn, Zn, Cu, B, Co, Mo), обеспечивающих нормальную жизнедеятельность клеток. Наиболее концентрированной средой для интенсивного культивирования считается среда Tamiya, позволяющая достигать высокой плотности биомассы [38].

Характерной особенностью *Chlorella* является значительная вариабельность биохимического состава в зависимости от условий культивирования. В стандартных условиях биомасса содержит:

- Белки: 50-55% сухого вещества
- Углеводы: 11-16%
- Липиды: 15-23%

При создании контролируемых стрессовых условий (дефицит азота, фосфора, изменение освещенности) метаболизм *Chlorella* становится чрезвычайно лабильным, что позволяет направленно регулировать состав биомассы в широких пределах:

- Содержание белка: от 8 до 60%+
- Углеводы: от 5 до 35%
- Липиды: от 5 до 80% [35,36]

Температурный режим и кислотность среды. Температурный режим является критически важным параметром культивирования. Оптимальный диапазон температур для *Chlorella* составляет 25-35°C, при этом переменный режим 24-30°C оказывается более благоприятным для роста, чем поддержание постоянной температуры. Изменения температуры преимущественно влияют на состав мембранных липидов, в меньшей степени затрагивая содержание триацилглицеридов (TAG). Зависимость роста биомассы от температуры имеет характерную колоколообразную кривую [37].

Кислотность среды (pH) также играет важную роль в регуляции метаболизма *Chlorella*. Допустимый диапазон pH составляет 7-9, при этом для поддержания оптимального уровня 6.5-7.5 обычно используют HNO<sub>3</sub> и KOH. Интересно, что отклонение pH от нейтрального значения (как в кислую, так и в щелочную сторону) способствует накоплению TAG, что важно для биотопливных приложений [36,37].

Освещение является одним из ключевых факторов, определяющих продуктивность *Chlorella* и особенности ее липидного обмена. Интенсивность светового потока, спектральный состав света и продолжительность светового

периода оказывают комплексное воздействие на физиологические процессы в клетках микроводорослей. Исследования показывают, что оптимальный спектральный диапазон для фотосинтеза *Chlorella* составляет 370-720 нм (фотосинтетически активная радиация, PAR), при этом световое насыщение достигается уже при 30% от полной солнечной радиации [38]. Эти данные имеют важное практическое значение при организации систем искусственного освещения в условиях промышленного культивирования.

При выборе источников искусственного освещения для культивационных установок наибольшую эффективность демонстрируют современные светодиодные системы, особенно с преобладанием красного и синего спектра, которые оптимально соответствуют пигментному составу хлоропластов *Chlorella*. Также широко применяются люминесцентные лампы и натриевые лампы высокого давления, хотя их спектральные характеристики менее оптимальны. Особого внимания заслуживает проблема фотоингибирования - избыточное освещение не только снижает эффективность фотосинтеза, но и в сочетании с дефицитом азота может приводить к уменьшению накопления липидов, что требует тщательного подбора и регулировки световых параметров для каждого конкретного штамма и условий культивирования [39].

При организации промышленного культивирования *Chlorella* применяют два принципиально разных типа систем - открытые и закрытые фотобиореакторы, каждый из которых имеет свои технологические особенности. Открытые системы, включающие как глубокие (24-48 см) естественные и искусственные водоемы, так и мелководные (5 мм-25 см) каскадные установки с наклонными лотками, отличаются относительно низкой производительностью (от 0.23 до 5 г/л/сут) [40]. Их основные недостатки связаны с трудностью контроля параметров культивирования (концентрации CO<sub>2</sub>, освещенности), выраженной сезонной зависимостью продуктивности, значительными суточными колебаниями температуры, повышенным испарением воды и высоким риском контаминации посторонними микроорганизмами. Эти ограничения существенно снижают эффективность и стабильность производственного процесса в открытых системах.

В отличие от открытых систем, закрытые фотобиореакторы обеспечивают полный контроль условий культивирования, более высокую продуктивность и возможность круглогодичного использования независимо от внешних климатических факторов. Особого внимания заслуживают трубчатые циркуляционные фотобиореакторы, которые сочетают преимущества закрытых систем с возможностью масштабирования производства. Их конструктивные особенности - минимальная толщина культурального слоя, компактность, наличие систем самоочистки и автоматизированной подачи газовой смеси - позволяют оптимизировать использование света и существенно повысить выход

биомассы. Сравнительные исследования убедительно демонстрируют, что закрытые системы, особенно циркуляционные фотобиореакторы, обеспечивают значительное (в несколько раз) увеличение продуктивности по сравнению с открытыми системами [41].

Эффективное промышленное культивирование *Chlorella* требует комплексного подхода, учитывающего взаимное влияние всех ключевых параметров - не только условий освещения и типа фотобиореактора, но и состава питательной среды, температурного режима, кислотности и других факторов. Грамотная оптимизация этих условий позволяет не только максимизировать выход биомассы, но и направленно регулировать ее биохимический состав в зависимости от целевого назначения - будь то производство биотоплива с высоким содержанием липидов, получение белковых кормовых добавок или создание фармацевтических препаратов на основе биологически активных веществ микроводорослей.

### **1.9 Экономические и экологические аспекты производства биодизеля из микроводорослей**

Производство биодизеля из микроводорослей рассматривается как одна из наиболее перспективных альтернатив традиционному ископаемому топливу, однако его широкое внедрение требует тщательного анализа экономической целесообразности и экологических последствий. В отличие от сельскохозяйственных культур, используемых для получения биотоплива первого поколения, таких как рапс или соя, микроводоросли обладают рядом уникальных преимуществ, но одновременно сталкиваются с существенными технологическими и коммерческими вызовами. С экономической точки зрения ключевым параметром является себестоимость производства, которая в настоящее время остаётся значительно выше, чем у традиционного дизельного топлива. Основные затраты связаны с процессами культивирования, сбора биомассы и экстракции липидов, при этом около 40-60% общих расходов приходится на этап выращивания микроводорослей. Особенно затратными оказываются системы закрытого типа (фотобиореакторы), обеспечивающие высокую продуктивность, но требующие значительных капитальных вложений и энергозатрат. Открытые пруды, хотя и дешевле в строительстве и эксплуатации, демонстрируют меньшую эффективность и стабильность производства, а также подвержены рискам контаминации. Важным экономическим фактором является также выход конечного продукта - современные штаммы микроводорослей способны накапливать до 50-60% липидов от сухой массы, однако в промышленных условиях эти показатели часто оказываются существенно ниже. Дополнительные расходы связаны с процессами переэтерификации липидов в биодизель и последующей очисткой топлива, что требует использования химических реагентов и энергии.

С экологической точки зрения производство биодизеля из микроводорослей обладает рядом неоспоримых преимуществ перед традиционными источниками энергии. Наиболее значимым является способность микроводорослей поглощать углекислый газ в процессе фотосинтеза - по оценкам исследователей, один гектар водорослевых плантаций может связывать до 100-150 тонн CO<sub>2</sub> в год, что в несколько раз превышает аналогичные показатели наземных растений. Это свойство открывает перспективы интеграции производственных мощностей с промышленными предприятиями для утилизации их выбросов, создавая систему замкнутого углеродного цикла. Важным экологическим аспектом является также отсутствие необходимости использования пахотных земель - в отличие от биотоплива первого поколения, производство микроводорослей не конкурирует с продовольственными культурами за сельскохозяйственные площади. Более того, многие виды микроводорослей могут успешно культивироваться на маргинальных землях с использованием солоноватых или даже морских вод, что значительно расширяет потенциальные производственные площади. Ещё одним экологическим преимуществом является существенно более низкое водопотребление по сравнению с традиционными сельскохозяйственными культурами - современные системы рециркуляции позволяют многократно использовать воду для культивирования микроводорослей.

Однако при всех своих преимуществах, производство биодизеля из микроводорослей сталкивается и с рядом экологических проблем, которые требуют внимательного рассмотрения. Одной из основных является энергетический баланс всего производственного цикла - некоторые исследования показывают, что при использовании традиционных технологий количество энергии, затрачиваемой на производство биодизеля из микроводорослей, может превышать энергетическую ценность получаемого топлива. Особенно энергоёмкими оказываются процессы сбора биомассы (центрифугирование) и сушки, на которые может приходиться до 70% всех энергозатрат. Решение этой проблемы видится в разработке более эффективных методов обработки биомассы, таких как флокуляция или мембранное фильтрование, а также в использовании возобновляемых источников энергии для обеспечения производственных процессов. Ещё одной экологической проблемой является утилизация побочных продуктов производства - после экстракции липидов остаётся значительное количество белково-углеводной массы, которая требует рационального использования. Наиболее перспективными направлениями переработки этих остатков представляются производство кормовых добавок, органических удобрений или получение биогаза через анаэробное сбраживание, что позволяет создать безотходное производство и улучшить общий экономический баланс предприятия.

Экономическая эффективность производства биодизеля из микроводорослей в значительной степени зависит от масштаба производства и применяемых технологий. Согласно последним исследованиям, себестоимость одного литра биодизеля из микроводорослей в промышленных масштабах может варьироваться от 0,5 до 2,5 долларов США, что пока существенно выше стоимости минерального дизельного топлива. Однако эксперты отмечают значительный потенциал для снижения затрат за счёт оптимизации технологических процессов и выведения более продуктивных штаммов микроводорослей. Ключевыми направлениями снижения себестоимости являются: повышение продуктивности культур (до 100-150 тонн сухой биомассы с гектара в год), разработка более эффективных и дешёвых систем культивирования, совершенствование методов сбора и переработки биомассы, а также создание комплексных производств с полной утилизацией всех побочных продуктов. Особые надежды связываются с разработкой штаммов микроводорослей, способных к автофлокуляции (самопроизвольному осаждению), что может значительно снизить затраты на сбор биомассы. Важным экономическим фактором является также государственная поддержка возобновляемой энергетики - налоговые льготы, субсидии и обязательные квоты на использование биотоплива могут существенно улучшить экономические показатели проектов.

Сравнительный анализ экологического следа биодизеля из микроводорослей и других видов биотоплива показывает его явные преимущества. По данным жизненного цикла (LCA-анализа), производство биодизеля из микроводорослей приводит к сокращению выбросов парниковых газов на 60-80% по сравнению с ископаемым дизельным топливом, что значительно превышает аналогичные показатели для биотоплива первого поколения. При этом использование непахотных земель и солоноватых вод позволяет избежать негативных последствий, связанных с изменением землепользования (ILUC), которые характерны для многих видов сельскохозяйственного биотоплива. Важным экологическим преимуществом является также значительно меньшее использование пестицидов и удобрений по сравнению с традиционными энергетическими культурами. Однако следует учитывать, что экологический баланс может существенно варьироваться в зависимости от конкретной технологии производства - например, использование закрытых фотобиореакторов, хотя и обеспечивает более высокую продуктивность, приводит к увеличению углеродного следа из-за больших энергозатрат на их обслуживание. Оптимальным с экологической точки зрения представляется комбинирование различных систем культивирования с максимальным использованием естественного освещения и возобновляемых источников энергии[42].

Перспективы коммерциализации производства биодизеля из микроводорослей во многом зависят от динамики цен на нефть и развития технологий возобновляемой энергетики. В условиях роста стоимости

ископаемого топлива и ужесточения экологического законодательства инвестиционная привлекательность этого направления будет неуклонно возрастать. Особый интерес представляют интегрированные производственные комплексы, сочетающие производство биотоплива с утилизацией CO<sub>2</sub> от промышленных предприятий, очисткой сточных вод и производством ценных сопутствующих продуктов (пигментов, белков, антиоксидантов). Важным фактором успеха станет развитие международной стандартизации и сертификации биотоплива из микроводорослей, что позволит создать стабильный рынок сбыта. Уже сегодня ряд компаний (Algenol, Solazyme, Sapphire Energy) демонстрируют успешные примеры промышленного внедрения этих технологий, хотя их масштабы пока остаются ограниченными. Дальнейший прогресс в этой области будет определяться совместными усилиями учёных, инженеров, экономистов и политиков, способных создать условия для устойчивого развития этой перспективной отрасли биоэкономики.

### **1.10 Мировые проекты по промышленному выращиванию хлореллы**

Промышленное выращивание микроводорослей, в частности хлореллы, становится всё более значимым направлением в биотехнологической и агропродовольственной отраслях. Этот микроорганизм обладает высокой питательной ценностью, способностью к быстрому росту и потенциалом для использования в производстве биотоплива, кормов, пищевых добавок и фармацевтических компонентов. Среди ключевых игроков этого рынка выделяются компании Algenol, Corbion и TerraVia, каждая из которых разрабатывает собственные технологии масштабирования производства хлореллы и других микроводорослей.

Algenol, американская компания, основанная в 2006 году, изначально фокусировалась на производстве биоэтанола из цианобактерий, но позднее расширила исследования на хлореллу как перспективный источник биомассы. Компания разработала закрытые фотобиореакторные системы, позволяющие контролировать условия выращивания и минимизировать загрязнение культуры. Масштабы производства Algenol оцениваются в несколько тысяч тонн биомассы в год, при этом основной вызов заключается в высокой себестоимости процесса из-за энергозатрат на поддержание освещения и температуры. Рентабельность производства пока остаётся под вопросом, однако компания получает поддержку от Министерства энергетики США в виде грантов на разработку более эффективных технологий[43].

Голландская Corbion, известная своими биотехнологическими решениями, также активно инвестирует в выращивание микроводорослей, включая хлореллу. В отличие от Algenol, Corbion делает акцент на пищевых и кормовых применениях, производя высокобелковую биомассу для рынка здорового питания. Компания использует открытые пруды и гибридные

системы культивирования, что позволяет снизить затраты по сравнению с полностью закрытыми реакторами. Объёмы производства Corbion достигают десятков тысяч тонн в год, а рентабельность обеспечивается за счёт премиального позиционирования продукции. Государственная поддержка в Нидерландах включает налоговые льготы для биотехнологических стартапов и финансирование исследований в области устойчивого сельского хозяйства[44].

TerraVia (ранее Solazyme) — ещё один значимый игрок, который, однако, в 2017 году объявил о банкротстве, несмотря на первоначальные успехи. Компания специализировалась на производстве масел и протеинов из микроводорослей, включая хлореллу, для пищевой и косметической промышленности. TerraVia применяла технологию гетеротрофного выращивания, при котором водоросли культивируются в темноте на сахаросодержащих субстратах, что позволяло достигать высокой плотности биомассы. Пиковые мощности компании составляли около 20 тысяч тонн продукции в год, однако высокая зависимость от стоимости субстратов и конкуренция с традиционными растительными маслами привели к финансовым трудностям. Несмотря на это, опыт TerraVia показал, что даже при наличии передовых технологий критически важным фактором остаётся экономическая эффективность производства[45].

Масштабы промышленного выращивания хлореллы в мире пока не достигают объёмов традиционных сельскохозяйственных культур, однако динамика роста впечатляет. По оценкам экспертов, глобальный рынок микроводорослей к 2025 году может превысить \$1 млрд, при этом хлорелла займёт значительную долю благодаря своим универсальным свойствам. Рентабельность производства сильно варьируется в зависимости от применяемых технологий: открытые системы дешевле, но менее продуктивны, тогда как закрытые фотобиореакторы обеспечивают высокую чистоту культуры, но требуют значительных капиталовложений. Государственная поддержка играет ключевую роль в развитии отрасли, особенно в виде финансирования НИОКР и субсидирования пилотных проектов. Например, в ЕС действуют программы Horizon 2020, направленные на развитие устойчивых биотехнологий, а в США Department of Energy активно инвестирует в альтернативные источники биотоплива[46].

Промышленное выращивание хлореллы представляет собой перспективное, но технологически сложное направление, где успех зависит от оптимизации производственных процессов, снижения себестоимости и государственной поддержки. Компании Algenol, Corbion и TerraVia демонстрируют разные подходы к решению этих задач, и их опыт служит важным ориентиром для будущих проектов в этой области.

### **1.11 Альтернативные направления использования биомассы хлореллы.**

Биомасса хлореллы, благодаря своему уникальному биохимическому составу и высокой адаптивности к различным условиям культивирования, находит применение в самых разных сферах человеческой деятельности. Одним из наиболее перспективных направлений является использование хлореллы в качестве кормовой добавки для животных и рыб. Высокое содержание белка, достигающее 50-60% от сухой массы, а также наличие незаменимых аминокислот, витаминов группы В, каротиноидов и микроэлементов делают её ценным компонентом рациона. В аквакультуре добавление хлореллы в корм усиливает иммунитет рыб, ускоряет их рост и улучшает качество мяса. В птицеводстве и животноводстве её использование способствует повышению продуктивности, улучшению состояния шерсти и перьев, а также снижению риска заболеваний за счёт иммуномодулирующих свойств. Кроме того, хлорелла может частично заменять дорогостоящие кормовые ингредиенты, такие как соевый шрот или рыбная мука, что делает её экономически выгодной альтернативой[47].

Не менее важным направлением является применение хлореллы в пищевой промышленности. Её биомасса служит источником полноценного белка, что особенно актуально для вегетарианцев и людей, придерживающихся диет с ограниченным потреблением животного протеина. Хлорелла богата витаминами А, С, Е, К, а также железом, магнием и цинком, что делает её ценным компонентом функциональных продуктов питания и биологически активных добавок. Исследования показывают, что регулярное употребление хлореллы способствует детоксикации организма, укреплению иммунной системы и улучшению работы желудочно-кишечного тракта. В некоторых странах её добавляют в хлебобулочные изделия, напитки и даже мясные продукты для обогащения их питательными веществами. Однако широкое внедрение хлореллы в пищевую промышленность сдерживается необходимостью устранения специфического вкуса и запаха, а также оптимизации технологий переработки для сохранения полезных свойств[48].

Ещё одним важным направлением является фикоремедиация – использование хлореллы для очистки сточных вод. Благодаря способности поглощать азот, фосфор, тяжёлые металлы и другие загрязняющие вещества, хлорелла эффективно применяется в системах биологической очистки. Микроводоросль не только удаляет вредные соединения, но и обогащает воду кислородом, что способствует восстановлению водных экосистем. Этот метод особенно актуален для очистки стоков сельскохозяйственных и промышленных предприятий, где традиционные методы могут быть недостаточно эффективными или экономически невыгодными. Кроме того, биомасса, полученная в процессе фикоремедиации, может быть использована в качестве сырья для производства биогаза, кормов или удобрений, что делает технологию безотходной[49].

Важную роль хлорелла играет в борьбе с изменением климата благодаря способности фиксировать углекислый газ. Промышленные предприятия, особенно тепловые электростанции и цементные заводы, выбрасывают значительные объемы  $\text{CO}_2$ , и интеграция систем культивирования микроводорослей позволяет снизить эти выбросы. Хлорелла поглощает углекислый газ в процессе фотосинтеза, причём её эффективность в десятки раз выше, чем у наземных растений. Некоторые проекты предусматривают прямое подавание дымовых газов в фотобиореакторы, где микроводоросли не только утилизируют  $\text{CO}_2$ , но и производят биомассу для дальнейшего использования. Это направление считается одним из ключевых в развитии зелёных технологий, хотя требует решения вопросов энергоэффективности и масштабирования[50].

Биомасса хлореллы представляет собой многофункциональный ресурс, применение которого выходит далеко за рамки традиционного использования в биотехнологии. Кормовые добавки, пищевые продукты, фикоремедиация и  $\text{CO}_2$ -фиксация – все эти направления демонстрируют огромный потенциал данной микроводоросли. Дальнейшие исследования и технологические разработки позволят расширить спектр её применения, способствуя развитию устойчивого сельского хозяйства, экологической безопасности и зелёной энергетики. Внедрение этих решений требует междисциплинарного подхода, объединяющего усилия биологов, инженеров и экологов, но потенциальные выгоды для общества и окружающей среды делают такие инвестиции оправданными.

## 2 Материалы и методы исследования

### 2.1 Материалы исследования

#### Объекты исследования

Объектами исследования были образцы, собранные из термальных источников Чунджа.

#### Питательные среды

##### **BG-11(г/л):**

$\text{NaNO}_3$  – 0,3;

$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  – 0,04;

$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,076;

$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,036;

Лимонная кислота – 0,006;

$\text{Fe}_2\text{SO}_4$  – 0,006;

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  – 0,02;

EDTA – 0,001;

Дистиллированная вода.

Раствор микроэлементов (1мл/л):

$\text{Na}_3\text{BO}_3$  – 2,86;

$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  – 1,81;

$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,022;

$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,079;

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,39;

$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,05).

##### **Zarruka (г/л):**

$\text{NaHCO}_3$  - 16,8;

$\text{K}_2\text{SO}_4$ -1,0;

$\text{NaNO}_3$  - 2,5;

$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2;

$\text{NaCl}$  - 1,0;

$\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  - 0,04;

$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ - 1,0;

Fe+EDTA раствор – 1 мл.

Дистиллированная вода.

Раствор микроэлементов (1мл/л):

$\text{H}_3\text{BO}_3$  – 2,86;

$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  – 1,81;

$\text{ZnSO}_4$  – 0,222;

$\text{MoO}_3$  – 0,018;

$\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 0,023.

**Тамиа (г/л):**KNO<sub>3</sub> – 5,0;MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O – 2,5;KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,25;

EDTA – 0,037;

FeSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O – 0,009;

Агар-агар – 20;

Дистиллированная вода – 11;

Раствор микроэлементов (1мл/л):

H<sub>3</sub>BO – 2.86;MnCl<sub>2</sub> × 4H<sub>2</sub>O – 1,81;Zn SO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O – 0,222;MoO<sub>3</sub> – 0,018;NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub> – 0,023;

## 2.2 Сбор полевых образцов

Отбор проб и определение физико-химических параметров для микробиологических исследований проводились в соответствии со стандартными общепринятыми методиками, обеспечивающими сохранение жизнеспособности изучаемых организмов. В летний период 2020 года были собраны образцы матообразующих микроводорослей из термальных источников Чунджа, при этом особое внимание уделялось правильности процедуры отбора и условиям транспортировки материала. Пробы отбирались многократно из одного источника с различных глубин, преимущественно с расстояния 5-10 см от поверхности водного зеркала, что позволяло получить репрезентативный материал для последующих исследований.

Сбор биологического материала проводился в период максимальной физиологической активности целевых организмов, что повышало достоверность получаемых результатов. Для отбора использовались как водные пробы, так и почвенные комья, содержащие микроводорослевые сообщества. Особое внимание уделялось сохранению жизнеспособности водорослей - все образцы аккуратно помещались в стеклянные банки небольшими порциями, что предотвращало повреждение клеток и сохраняло естественную структуру микробных матов.

Для обеспечения надлежащего качества проб применялись специальные требования к таре. Использовались исключительно чистые стеклянные бутылки, предварительно простерилизованные и промытые дистиллированной водой. Каждая емкость заполнялась не более чем на 2/3 объема, что создавало необходимый воздушный зазор и предотвращало деформацию проб при транспортировке. Все емкости укупоровались ватно-марлевыми пробками, обеспечивающими газообмен и одновременно защищающими от попадания посторонних микроорганизмов.

Условия хранения и транспортировки проб были строго регламентированы. В полевых условиях образцы хранились при температуре не выше 20°C с рассеянным освещением, что имитировало естественные условия обитания водорослей. Для длительного хранения (2-3 недели) пробы помещались в холодильник с температурным режимом 2-5°C. После выделения чистых культур требовался немедленный перенос материала в питательные среды для предотвращения потери жизнеспособности.

Особое внимание уделялось подготовке лаборатории перед началом исследований. Все работы проводились в условиях строгой стерильности: осуществлялась тщательная обработка лабораторной посуды (колбы объемом 2 л, 1 л, 500 мл и 250 мл, пипетки, чашки Петри) согласно стандартным протоколам стерилизации. Параллельно проводилась подготовка питательных сред, состав которых подбирался в соответствии с особенностями изучаемых микроводорослей. Обязательным этапом был контроль стерильности лабораторных помещений и оборудования, включая проверку эффективности работы ламинарных шкафов и стерилизаторов. Такой комплексный подход к отбору и подготовке проб обеспечивал высокую достоверность последующих микробиологических исследований и культивирования выделенных штаммов микроводорослей.

### **2.3 Лабораторное культивирование микроводорослей**

Процесс получения накопительной культуры микроводорослей начинается с создания специальных селективных условий, способствующих преимущественному развитию целевых микроорганизмов при одновременном подавлении конкурирующих видов. Для этого используются стандартные питательные среды, такие как BG-11, Zaruka и Tamiya, состав которых оптимально подходит для культивирования большинства штаммов микроводорослей. Эти среды содержат полный набор макро- и микроэлементов, необходимых для активного роста фотосинтезирующих микроорганизмов [51].

Технология посева предполагает тщательную подготовку стерильных колб объемом 250-500 мл, которые заполняются питательной средой примерно на 1/3-1/4 объема для обеспечения достаточной аэрации. После внесения образцов культуру инкубируют при контролируемой освещенности в диапазоне 2000-10000 лк, что создает оптимальные условия для фотосинтетической активности микроводорослей. В процессе культивирования особое внимание уделяется оптимизации ключевых параметров, включая температурный режим, световые условия и интенсивность аэрации, которые подбираются индивидуально для каждого штамма. Важным аспектом является создание селективного давления на конкурирующие виды микроорганизмов, что достигается путем регулировки

pH среды, концентрации питательных веществ и других физико-химических параметров [52].

Для контроля качества культуры и идентификации микроорганизмов проводится регулярное микроскопирование по стандартной методике. Процедура начинается с приготовления препарата на обезжиренном предметном стекле, куда наносится капля водопроводной воды. Строго соблюдая правила асептики, бактериологической петлей отбирают пробу культуры и вносят ее в каплю воды, тщательно перемешивая. Полученную суспензию накрывают покровным стеклом, избегая образования пузырьков воздуха, которые могут мешать наблюдению. Исследование проводят сначала при малом увеличении ( $\times 10$ ), что позволяет оценить общую картину и выбрать наиболее информативные участки, а затем переходят к детальному изучению при увеличении  $\times 40$ .

При микроскопировании соблюдается определенный порядок действий: сначала проводится первичный осмотр нескольких полей зрения при малом увеличении, затем выбранный объект позиционируется в центре поля зрения, после чего увеличение меняется на  $\times 40$  путем вращения револьвера микроскопа. Особое внимание уделяется чистоте препарата - отсутствию посторонних примесей и артефактов, которые могут исказить результаты наблюдения. При работе с иммерсионными объективами тщательно контролируется качество иммерсионного масла, так как его недостатки могут существенно снижать разрешающую способность микроскопа.

Данная методика, сочетающая современные подходы к культивированию микроорганизмов с классическими методами микроскопии, позволяет эффективно выделять, идентифицировать и изучать целевые штаммы микроводорослей. Стандартизация всех этапов работы - от посева до микроскопического исследования - обеспечивает воспроизводимость результатов и достоверность получаемых данных, что особенно важно при проведении научных исследований и промышленном культивировании микроводорослей. Применение этой методики способствует успешному решению широкого круга задач - от фундаментальных исследований физиологии микроводорослей до прикладных работ по созданию высокопродуктивных штаммов для биотехнологического применения [53].

## **2.4 Методы культивирования микроводорослей на жидких и агаризованных средах**

Готовность культуры. Перед началом эксперимента клетки микроводорослей переносили с скошенного агара или из жидкой среды, на которой поддерживалась культура, в чашки со свежеприготовленной питательной средой того же состава, который использовался в исследовании. В экспериментах с разными культурами предварительное выращивание

проводили для всех штаммов в один день и с одинаковым количеством клеток или равной биомассой микроводорослей. Колбы с культурой помещали на свет на 4–6 дней для роста.

Культивирование микроводорослей на жидких и агаризованных средах. Штаммы микроводорослей выращивали на жидкой и агаризованной средах Тамия. Микроводоросли культивировали в конических колбах объемом 250–1000 мл при освещении солнечным светом (4000 люкс) и температуре 25–28°C. Для приготовления твердых питательных сред использовали 1,5–2% агар-агара. Стерилизацию проводили при 1 атм в течение 30 минут.

Полученную биомассу отделяли от частиц питательной среды центрифугированием при 5000 об/мин, промывали дистиллированной водой. Процедуру повторяли трижды.

Приготовление бактериологически чистых культур микроводорослей осуществляли путем добавления в питательную среду антибиотиков (пенициллина и флуконазола).

Флуконазол в концентрации 50 мкг/мл не влияет на скорость размножения хлореллы, но полностью подавляет рост всех тестируемых грамотрицательных бактерий.

Концентрация 200 мкг/мл угнетает рост хлореллы и является бактерицидной для всех исследуемых микроорганизмов.

Для выделения бактериологически чистых культур из ранее полученных альгологически чистых также использовали метод Пастера:

В ходе эксперимента в стерильные пробирки вносили по 5 мл дистиллированной воды или питательного раствора, после чего герметично закрывали их пробками и подвергали стерилизации в автоклаве. Параллельно подготавливали аналогичное количество пробирок с агаризованной питательной средой, содержащей 0,5-1% глюкозы. Посевной материал переносили в первую пробирку со стерильной водой, используя стерильную пипетку или бактериологическую петлю. После тщательного перемешивания для получения гомогенной суспензии отбирали 1 мл полученного раствора и последовательно переносили во вторую, а затем в третью пробирку со стерильным раствором. Количество необходимых разведений варьировалось в зависимости от исходной концентрации клеточной суспензии и определялось эмпирически для достижения оптимальной плотности посева.

Перед посевом агаризованную среду расплавляли на водяной бане при температуре 40-50°C, после чего стерильно переносили в чашки Петри. Посев осуществляли из пробирок с последним разведением на поверхность питательного агара с добавлением глюкозы. Инкубацию проводили в перевернутом положении при оптимальных световых условиях. Наблюдения показали, что на средах с глюкозой видимый рост колоний появлялся уже через 5 суток, в то время как на других питательных средах для развития видимых колоний требовалось несколько недель инкубации.

Пересевы проводили на жидкие и агаризованные среды в чашках Петри и пробирках, которые культивировали при освещении 2–4 тыс. люкс. Из выросших колоний водорослей делали пересев на жидкую среду или скошенный агар. Бактериально очищенную культуру микроводорослей хранили в стерильных условиях длительное время.

Поддержание и хранение микроводорослей. После получения отдельных колоний микроводоросли переносили стерильной петлей из чашек в колбы с жидкой средой или в пробирки со скошенным агаром (по аналогии с микробиологическими методами).

После посева колбы и пробирки помещали на свет для наращивания биомассы в течение 1–1,5 недель. Для этого использовали лабораторный шкаф с лампами, установленными под каждой полкой. Пробирки помещали в кристаллизатор, частично накрытый стеклом; на дно наливали воду для поддержания влажности, что улучшало рост водорослей и предотвращало высыхание агара. Культуру периодически встряхивали. После активного роста (по позеленению жидкости или появлению зеленого налета на агаре) колбы и пробирки переносили в холодильник (6–10°C) с постоянным слабым освещением (300–500 люкс от лампы накаливания 15 Вт или люминесцентной лампы).

В таких условиях культуру можно хранить неограниченное время, пересаживая лишь раз в 1,5–2 месяца из-за высыхания агара.

Приготовление сгущенной суспензии микроводорослей. Для получения концентрированной суспензии микроводоросли промывали дистиллированной водой для удаления солей, затем центрифугировали и сушили при 55–60°C.

Измерение размеров водорослей. При анализе видового состава водорослей измеряли их размеры, являющиеся важным диагностическим признаком. Для измерения использовали окуляр-микрометр с измерительной шкалой. Цену деления окуляр-микрометра определяли с помощью объект-микрометра для каждого микроскопа или объектива. Все исследуемые объекты зарисовывали с использованием рисовального аппарата и фотографировали.

Определение оптимального режима роста микроводорослей проводили путем культивирования на жидкой среде Тамия при разной освещенности (1000–4000 люкс), температуре (5–28°C) и рН (5–8) с последующим подсчетом количества клеток в камере Горяева.

Контроль осуществляли путем ежедневного подсчета клеток в 1 мл суспензии с использованием камеры Горяева в течение 7 дней.

Подсчет количества клеток с помощью камеры Горяева. Каплю культуры наносили на сетку и накрывали покровным стеклом. Излишки жидкости удаляли фильтровальной бумагой. Под микроскопом подсчитывали количество клеток в определенных квадратах, затем, зная площадь и высоту камеры, пересчитывали их количество на 1 мл суспензии.

При работе с камерой Горяева количество клеток в 1 квадрате рассчитывали по формуле 1:

$$n = \frac{m}{16 \times 25} \quad (1)$$

где  $n$  - количество клеток в 1 квадрате камеры Горяева,  
 $m$  - общее количество клеток в 25 больших квадратах камеры Горяева.  
Затем количество клеток в 1 мл суспензии рассчитывается по формуле 2:

$$x = n \times 4 \times 10^6 = \frac{4m}{16 \cdot 25} \times 10^6 = \frac{m}{100} \times 10^6 \quad (2)$$

где  $x$  - количество клеток в 1 мл суспензии;  
 $n$  - количество клеток в 1 квадрате камеры Горяева;  
 $m$  - общее количество клеток в 25 больших квадратах камеры Горяева [54].

Гарантия полезности развития биомассы. Чтобы разделить динамичные типы микроводорослей, фундаментальная корреляция и выбор сообществ были выполнены с использованием наименее сложных границ, например, скорости развития в банках с жидкой средой.

Динамичные (полезные) виды микроводорослей были выбраны по скорости развития исследуемых структур, учитывая, что количество вводимого семенного материала в среде было примерно одинаковым. Скорость развития контролировалась путем увеличения количества клеток и биомассы.

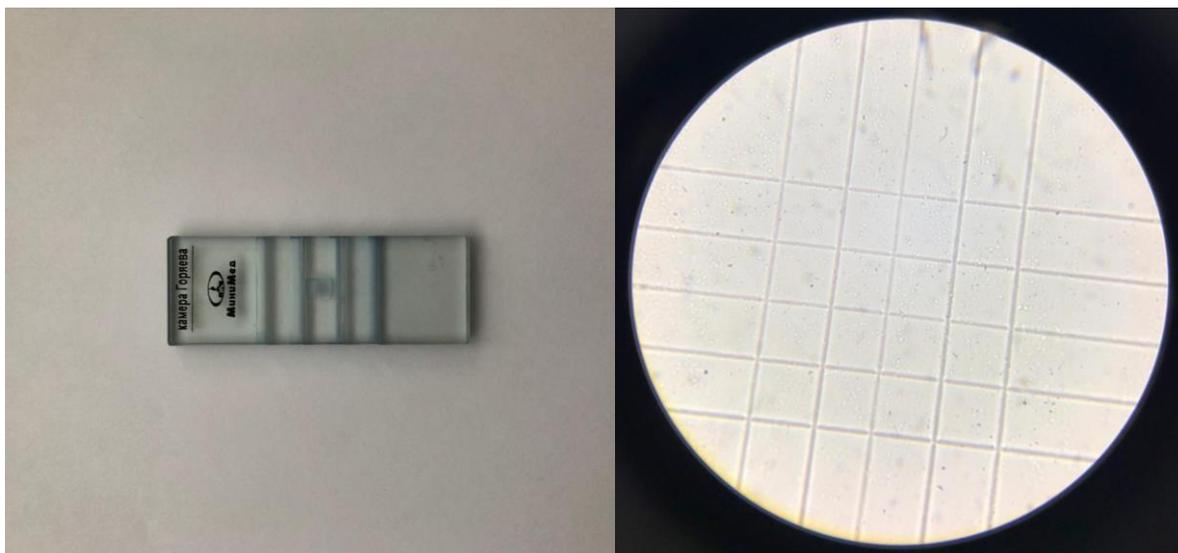


Рисунок 1. Камера Горяева

## 2.5 Выращивание *Chlorella vulgaris* (Н-1) и *Chlorella sp.* (СН-2)

Целью исследования было определить идеальные условия для развития микроводорослей *Chlorella vulgaris* (СН-1) и *Chlorella sp.* ((Н2) с высоким содержанием липидов для их дальнейшего использования в производстве биотоплива (рисунок 2). Анализы были выполнены в соответствии с прилагаемыми стандартными условиями [50]:

- 1) содержание семян составляло 25% от общего количества суспензий;
- 2) для культивирования этих штаммов наиболее подходящей является среда Таиуа;
- 3) рН = 6,5-7,5;
- 4) барботирование суспензии во всех экспериментах осуществляли с помощью аэратора;
- 5) фотопериод составлял 24 часа;
- 6) каждые три дня во взвешенном состоянии наблюдали за отклонениями и ростом.

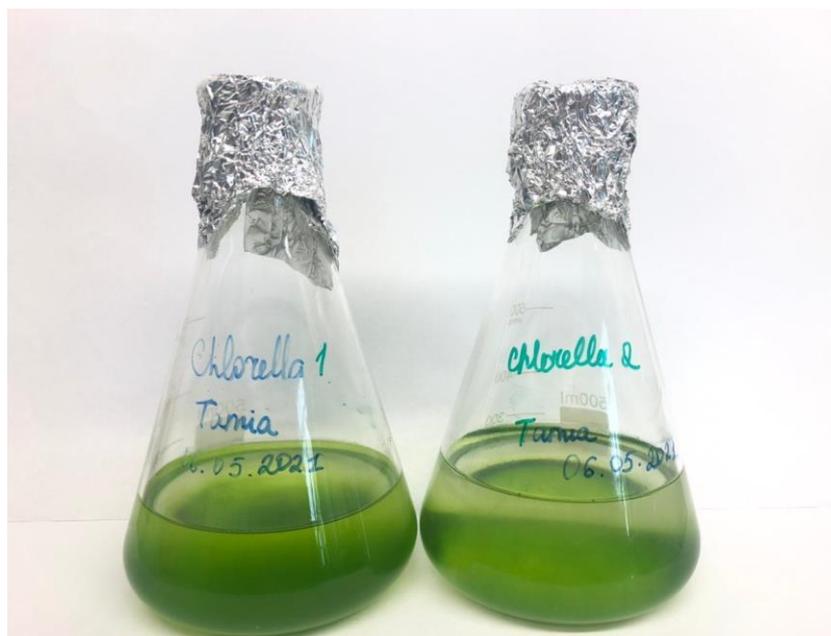


Рисунок 2. Флаконы с образцами хлореллы

Определение концентрации клеток осуществлялось путем непосредственного наблюдения и подсчета с помощью камеры Горяева. Процесс периодического культивирования биомассы микроводоросли Хлорелла в технологии производства биотоплива третьего поколения состоит из двух периодов: накопление биомассы микроводоросли до концентрации 50-55 млн клеток/мл и выше.

Культивируется в этих условиях в течение 10-12 дней.

## **2.6 Моделирование и обоснование выбора формы фотобиореактора для культивирования образцов микроводорослей**

В ходе работы была разработана модель резервуара наиболее популярной формы среди производителей хлореллы, а также форма, при которой ожидается наиболее равномерное распределение излучения. Целью данной работы был выбор конфигурации резервуара фотобиореактора для наиболее эффективного выращивания хлореллы в искусственных условиях, за счет лучшего распределения излучения по объему суспензии [51].

Проанализировав полученные данные, можно сделать вывод, что наиболее равномерное распределение в резервуарах цилиндрической формы наблюдается снижение радиации, так как при прямоугольной форме возникают потери излучения на стыках.

Градуированный цилиндр (500 мл) смоделирован как фотобиореактор (рис. 3).



Рисунок 3. Модель фотобиореактора[52]

Перемешивание и обогащение кислородом обеспечивается за счет аэрации. Кроме того, одна из трубок аэратора погружена в камеру для равномерного распределения тепла от нагревательного элемента.

Аэратор выполняет две функции [53]:

- подача воздуха в каждый стакан обеспечивает выращивание хлореллы;
- перемешивание воздуха, подача воздуха осуществляется с помощью трубок с наконечниками в виде диффузоров.

## 2.7 Количественное определение общей фракции липидов методом экстракции Сокслета

Перед выделением липидов из биомассы важно их накопить. Фиксация биомассы - отделение биомассы от фотобиореактора. К методам фиксации относятся: центрифугирование, фильтрация, отстаивание, флокуляция. У этих методов есть свои недостатки и преимущества.

Суспензию необходимо промыть чистой средой Tamiya несколько раз, после каждой процедуры промывки ее необходимо центрифугировать. Биомассу концентрировали центрифугированием. Пасту из микроводорослей высушивали до воздушно-сухого состояния в бройлере при температуре 40-45°C [54].

Выделение липидов осуществляется путем отжима и экстракции.

В статье представлена иллюстрация такой стратегии получения липидов из образцов хлореллы.

Более совершенным методом, в отличие от отжима, является более практичная стратегия - экстракция. Экстракция - это способ удаления частиц из твердых или текучих веществ с использованием растворяемого вещества (экстрагента), способного отделять только необходимые сегменты. Экстракцию проводили в аппарате Сокслета (рис. 4). Пасту из микроводорослей массой 10 г загружают в экстрактор, в колбу наливают экстрагент объемом 60 мл. Экстрагент Фолча, хлороформ и метанол, берут в соотношении 2:1, полученную мисцеллу переливают в мерную колбу и удаляют растворитель. [55].

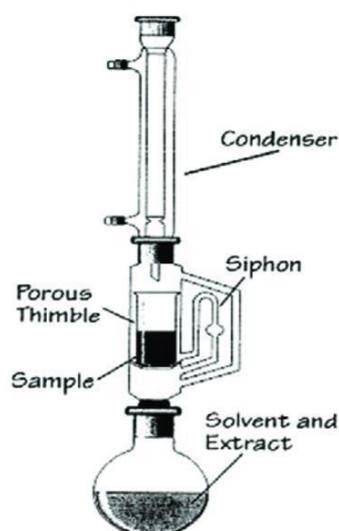


Рисунок 4. Аппарат Сокслета [56]

После завершения экстракции подсчитывают количество полученных липидов и процентное содержание липидов рассчитывают с использованием математической формулы (1):

$$\text{Содержание липидов \%} = \frac{\text{вес(липид в колбе)} - \text{вес(колба)}}{\text{вес(микроводоросли)}} * 10$$

(3)

## Результаты и обсуждение

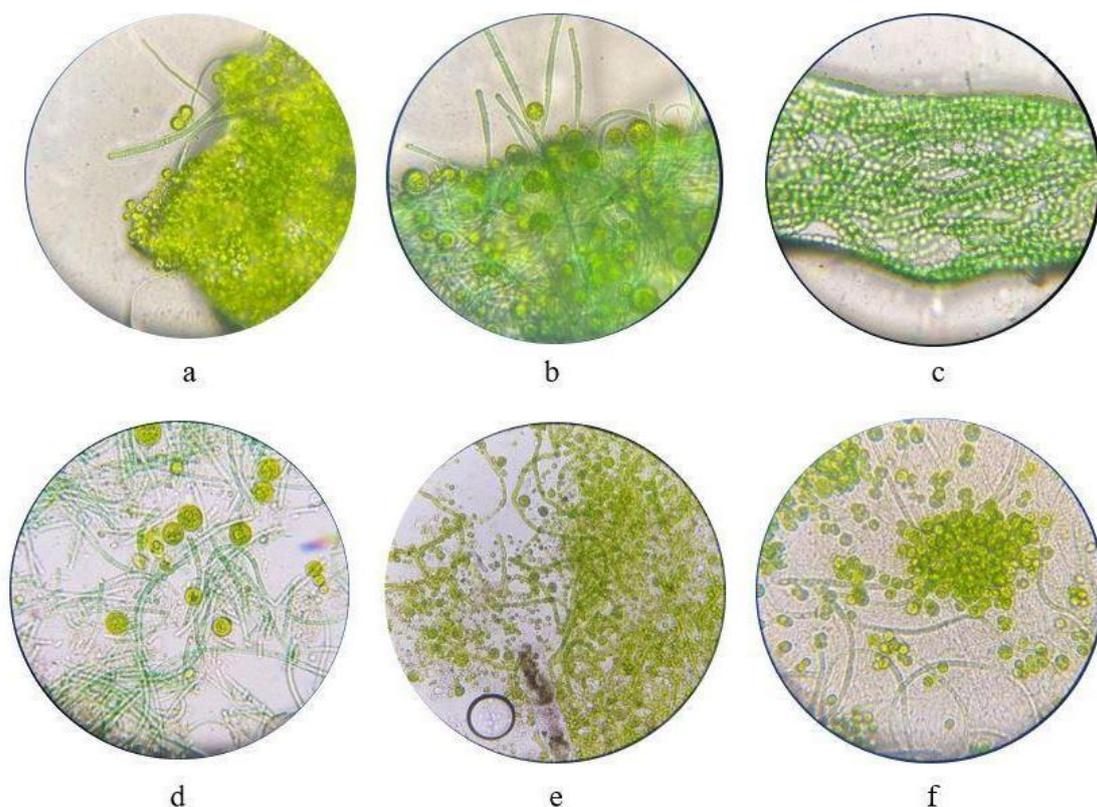
### 3.1 Разнообразие видов микроводорослей в обогащенной культуре

Было приготовлено семь колб с обогащенной культурой (рисунок 5). Поскольку они были собраны из разных мест, предполагалось, что они содержат разные виды микроорганизмов.



Рисунок 5. Колбы с обогащенной культурой

В результате микроскопии были получены следующие изображения (рис. 6):



- a – Термальный источник Чунджа 1
- b – термальный источник Чунджа 2
- c – термальный источник Чунджа 3
- d – термальный источник Чунджа 4
- e – термальный источник Чунджа 5
- f – термальный источник Чунджа 6

Рисунок 6. Микроорганизмы, содержащиеся в 6 обогащенных культурах

Как показано на рисунке выше, обогащенные культуры состояли как из микроводорослей, так и из цианобактерий. Для идентификации каждого присутствующего организма был проведен визуальный микроскопический контроль. В соответствии с этим, там были виды *Chlorella sp.*, *Anabaena*, *Nostoc sp.*, *Microcystis*, *Synechocystis*, *Chlamydomonas*, *Rivularia* и др.

### 3.2 Посев образцов на различные питательные среды

После исследования обогащенных культур на наличие микроорганизмов их посеяли в различные питательные среды с соблюдением всех мер асептики. Состав питательных сред подобран в соответствии с предполагаемым альгологическим составом образцов (таблица 2).

Таблица 2

Список образцов, инокулированных в различные культуральные среды

Образцы питательных культур	Культурные медиа
Термальный источник Чунджа 1	BG-11; Zarruka;
Термальный источник Чунджа 2	BG-11; Zarruka; Tamyia;
Термальный источник Чунджа 3	BG-11;
Термальный источник Чунджа 4	BG-11; Tamyia;
Термальный источник Чунджа 5	BG-11; Zarruka;
Термальный источник Чунджа 6	BG-11; Tamyia;
Термальный источник Чунджа 7	BG-11; Zarruka; Tamyia;

Все культуры хранили в климатической камере с боковым освещением оптимальной интенсивности и температурой 25-30°C.

### 3.3 Получение водорослей, логически чистых микроводорослей



Рисунок 7. Чунджа - 1 (22.9.20).

Для выделения чистых культур микроводорослей и их отделения от сопутствующей микрофлоры применяли метод последовательных разведений по Пастеру. Из исходной хранящейся культуры отбирали 1 мл клеточной суспензии, которую затем последовательно разводили в 3-4 стерильных пробирках, уменьшая концентрацию клеток в каждом последующем разведении в 10 раз. Количество необходимых разведений определялось исходной плотностью клеточной суспензии. На заключительном этапе работы две последние пробирки с наиболее разведенными суспензиями использовали

для посева на твердую питательную среду BG-11, содержащую 2% агар-агара. Такой подход позволил получить изолированные колонии и выделить чистые культуры целевых микроводорослей, свободные от посторонней микрофлоры.



Рисунок 8. *Chlorella sp.* и *Chlorella vulgaris*

### 3.4 Получение биологически чистых микроводорослей.

Клетки, полученные после сортировки или последовательного разведения, разделяли на среде BG-11 с агаром, содержащим антибиотик флуконазол в концентрации 50 мкг мл<sup>-1</sup>. После 10-14 дней инкубации при температуре 25-30°C в среде было отмечено образование отдельных колоний микроводорослей. Проведение трех последовательных пересадок отдельных колоний культур на среду BG – 11 с агаром позволило нам получить чистые культуры микроводорослей. Чистота полученных культур микроводорослей

была подтверждена отсутствием сопутствующей микрофлоры (бактерий и грибов). Итак, были получены 2 чистых штамма.

### 3.5 Скрининг продуктивности микроводорослей

Процесс скрининга проводился с использованием камеры Горяева.

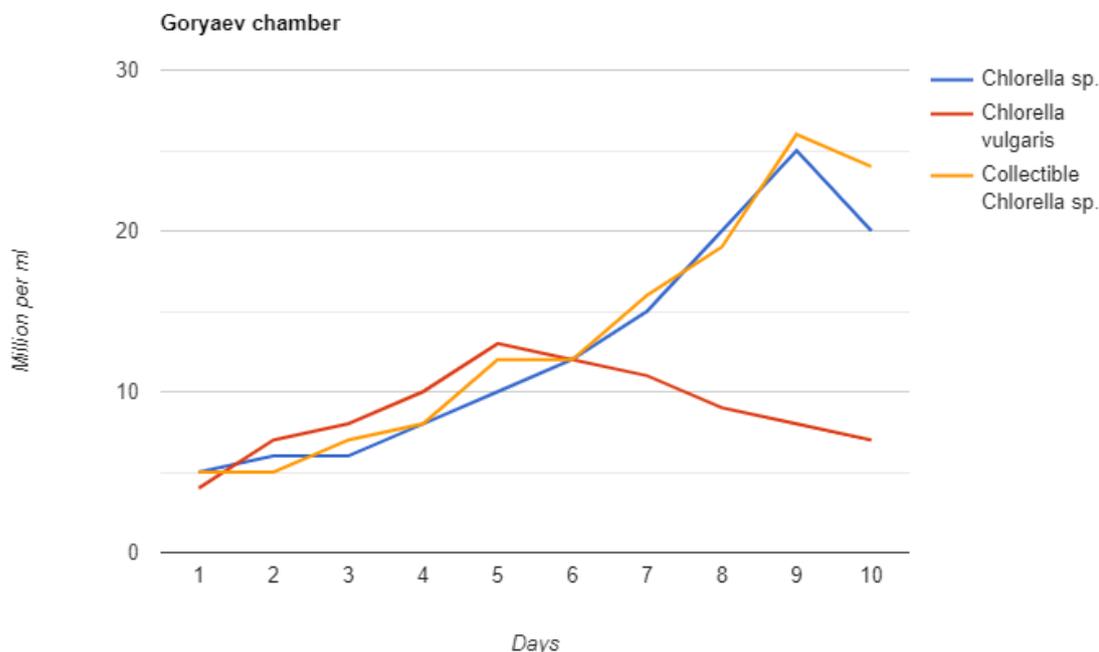


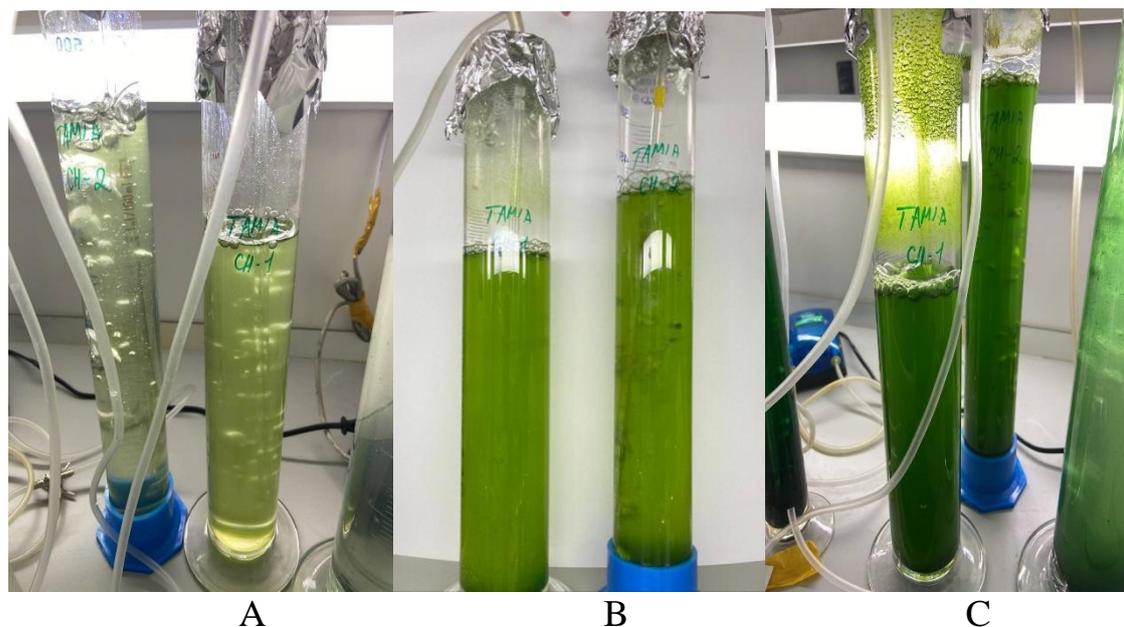
Рисунок 9. Скорость роста микроводорослей.

Образцы микроводорослей отбирали каждые 1 день. Микроскопировали 1 мл образца и подсчитывали количество клеток на камере Горяева. После расчетов по формулам 1 и 2 был построен график. Она состоит из 3 линий: *Chlorella sp.*, *Chlorella vulgaris* и коллекционной *Chlorella sp.* Результаты исследований *Chlorella sp.* и коллекционной *Chlorella sp.* были примерно такими же. Наибольшая активность наблюдалась у коллекционной хлореллы. Наименее активной была хлорелла обыкновенная.

Объектом исследования были штаммы микроводорослей *Chlorella vulgaris* (СН-1) и *Chlorella sp.* (СН-2). В качестве питательной среды была выбрана Тамия. Среда Тамия используется в различных разведениях для культивирования микроводорослей. По химическому составу компонентов она содержит все необходимые элементы, необходимые для интенсивного размножения микроводорослей.

Оригинальные штаммы микроводорослей *Chlorella vulgaris* (СН-1) и *Chlorella sp.* (СН-2) были использованы для инокуляции в стеклянные емкости с питательной средой, в виде градуированных цилиндров. Стеклянные сосуды

освещались светодиодной фитолампой. Посевной материал для фотобиореактора составлял 20% от общего объема суспензии.



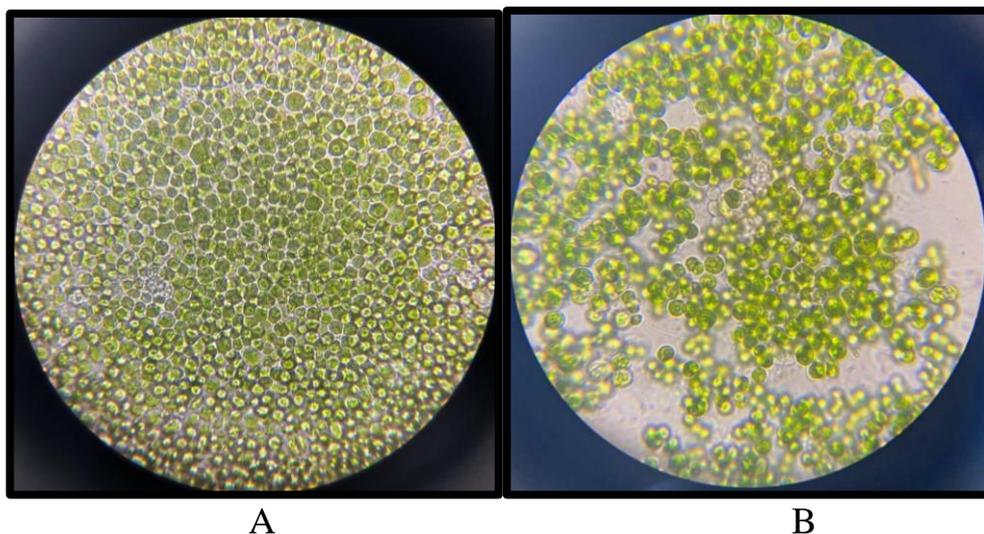
А- 1-й день, В- 3-й день, С-12-й день.

Рисунок 10. Производство биомассы в фотобиореакторах

Микроводоросли культивировали в фотобиореакторе объемом 500 мл в течение 12 дней. Температуру культивирования поддерживали на уровне 25°C.

Определение продуктивности микроводорослей проводят путем подсчета клеток культуры с помощью камеры Горяева. Для этого проводят непрерывное культивирование микроводорослей в течение 3 дней с концентрацией клеток 24,15 млн/мл в СН-1 и 38,77 млн/мл в СН-2. Через 3 дня количество клеток достигло 60,3 млн/мл в СН-1 и 78,26 млн/мл в СН-2. Увеличение объема в среднем составило 35 млн/мл. После 12 дней культивирования биомассу центрифугировали, высушивали и взвешивали. В общей сложности из СН-1 было получено 12,4 г, а из СН2 - 17,2 г (рисунок 10).

Было проведено микроскопическое исследование образцов (рис. 11).



А- СН-1, В-СН-2

Рисунок 11. Образцы под микроскопом

Высушенную биомассу микроводорослей (рисунок 12) экстрагировали для выделения липидной фракции. Содержание липидов определяли в липидной фракции. Количественное определение липидных компонентов микроводорослей проводили методом экстракции в аппарате Сокслета.



Рисунок 12. Полученная биомасса

### 3.6 Расчет содержания липидов в образцах микроводорослей

Образец СН-1= 10 г

Пустая колба = 120 г

Колба с экстрагированным маслом = 122,921 г

Содержание липидов  $\% = \frac{122.921-120}{10} * 100 = 29.21\%$

Образец СН-2 = 10 г

Пустая колба = 120 г

Колба с экстрагированным маслом = 123,713 г

Содержание липидов  $\% = \frac{123.713-120}{10} * 100 = 37.13\%$



Рисунок 13. Экстракция липидов в аппарате Сокслета

Таблица 3.

Содержание липидов в образцах

Образцы	Содержание липидов %
СН-1	29.21%
СН-2	37.13%
Среднее	33.17%

### 3.7 Сравнение содержания липидов в *Chlorella vulgaris* (СН-1) и *Chlorella sp.* (СН-2)

Определение продуктивности микроводорослей путем подсчета клеток культуры с помощью камеры Горяева показало быстрый рост СН-2, в отличие от СН-1. При экстракции липидов в аппарате Сокслета было обнаружено, что

в СН-1 содержится 29,21% липидов, в то время как в СН-2 их 37,13%. Учитывая их общее содержание липидов, можно утверждать, что Ср-2, имеющий более высокое содержание липидов, оказывается более выгодным вариантом для производства биодизельного топлива.

Клетки СН-2 крупнее и более продуктивны, поэтому в ходе наблюдения было выявлено высокое содержание липидов. Клетки СН-1 меньше по размеру и менее продуктивны, что также привело к снижению содержания липидов. Это говорит о том, что условия, которые были созданы, вероятно, более подходят для СН-2, чем для СН-1.

## Заключение

Микроводоросли имеют широкие перспективы для использования в различных пищевых продуктах, таких как биотопливо, высокопротеиновые корма для животных и другие высококачественные продукты питания, поскольку они могут расти на невозделываемых землях и перерабатывать отходы и соленую воду.

Использование микроводорослей может быть подходящей альтернативой, поскольку микроводоросли являются наиболее эффективными биологическими производителями жирных кислот на планете и многофункциональным возобновляемым источником биомассы. Биодизель, основанный на фотосинтезе водорослей, растущих на CO<sub>2</sub>, обладает большим потенциалом в качестве биотоплива. Эти организмы должны серьезно рассматриваться в качестве заменителя растительных масел для производства биодизельного топлива.

Из термального источника Чунджа, расположенного в Уйгурском районе Алматинской области на юго-востоке Казахстана, было взято семь проб воды и доставлено в лабораторию. Там образцы были помещены в подготовленные колбы, где в дальнейшем была получена культура обогащения. Культуры состояли из смеси нескольких микроорганизмов, включая микроводоросли и цианобактерии, такие как *Chlorella sp.*, *Anabaena*, *Nostoc sp.*, *Microcystis*, *Synechocystis*, *Chlamydomonas*, *Rivularia* и др. Чтобы отличить их друг от друга, образцы были посеяны в селективные питательные среды.

Данная работа посвящена скринингу штаммов микроводорослей, перспективных для производства биодизельного топлива. Из родниковой воды Чунджа было отобрано 7 образцов. Используя биотехнологические и микробиологические методы, только 2 вида микроводорослей были очищены водорослевым и бактериологическим методами. Согласно результатам скрининга, микроводорослями с наибольшим потенциалом продуктивности были *Chlorella sp.* и *Chlorella vulgaris*. В качестве контроля была взята коллекционная хлорелла sp. которую использовали для сравнения результатов отобранных образцов.

Проведенные исследования позволяют сделать вывод о высокой перспективности штаммов *Chlorella sp.* и *Chlorella vulgaris* для промышленного получения биодизельного топлива. Данные микроорганизмы демонстрируют оптимальное сочетание биохимических характеристик, включая высокую скорость роста биомассы и повышенное содержание липидов, что делает их особенно ценными для биотехнологического применения. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности дальнейшего изучения этих штаммов в рамках разработки технологий масштабирования производства. Особое внимание при последующих исследованиях следует уделить оптимизации параметров культивирования

что позволит максимально раскрыть потенциал данных микроорганизмов для коммерческого производства биотоплива.

В настоящее время микроводоросли, содержащие нейтральные липиды, являются перспективным источником для производства биотоплива. Микроводоросли не конкурируют с другими масличными растениями и очень продуктивны в своей работе. Использование микроводорослей снизит загрязнение окружающей среды, поскольку они безвредны для окружающей среды.

Однако для создания технологии производства биодизельного топлива из такого возобновляемого источника энергии, как микроводоросли, необходимо учитывать следующие аспекты:

1. Необходимо выбрать штамм микроводорослей – продуцентов липидов с высокой скоростью роста. Для культивирования были отобраны штаммы микроводорослей *Chlorella vulgaris* (СН-1) и *Chlorella sp.* (СН-2), которые способны продуцировать большее количество липидов, чем другие рассмотренные, и пригодны для культивирования практически в любых условиях. С помощью аппарата Сокслета был проведен химический анализ биомассы водорослей, который показал, что содержание липидов в *Chlorella vulgaris* (СН-1) составляет 29,21%, а в *Chlorella sp.* (СН-2) - 37,13%. Была проведена сравнительная оценка двух образцов, которая показала преимущество СН-2.

2. Необходимо контролировать такие условия культивирования, как температура, рН, источник света, питательная среда, конструкция фотобиореактора, которые обеспечивают активацию так называемого “липидного триггера” - комплекса факторов, обеспечивающих максимальный выход обогащенной липидами биомассы.

3. Разработка фотобиореактора с высокой производительностью. Фотобиореактор должен соответствовать всем требованиям.

4. Максимальное извлечение липидов требует тщательной работы и правильного выполнения процедуры на аппарате Сокслета.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Piligaev A.V. Isolation and study of the properties of lipid-producing microalgae strains and their biocatalytic processing into biodiesel: cand. dis. bio. sci. – Novosibirsk, 2018. – 5 p.
- 2 Barsanti L, Coltelli P, Evangelista V, Frassanito AM, Passarelli V, Vesentini N, Gualtieri P. Oddities and curiosities in the algal world. In: Evangelista V, Barsanti L, Frassanito AM, Passarelli V, Gualtieri P, editors. Algal toxins: nature, occurrence, effect and detection. Dordrecht: Springer; 2015. pp. 353–391.
- 3 Khan, Muhammad Imran, Jin Hyuk Shin, and Jong Deog Kim. “The Promising Future of Microalgae: Current Status, Challenges, and Optimization of a Sustainable and Renewable Industry for Biofuels, Feed, and Other Products.” *Microbial Cell Factories* 17, no. 1 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>.
- 4 Safi, Carl, Bachar Zebib, Othmane Merah, Pierre-Yves Pontalier, and Carlos Vaca-Garcia. “Morphology, Composition, Production, Processing and Applications of *Chlorella Vulgaris*: A Review.” *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 35 (2014): 265–78. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>.
- 5 Sydney, E. B., Sydney, A. C. N., de Carvalho, J. C., & Soccol, C. R. (2019). Potential carbon fixation of industrially important microalgae. *Biofuels from Algae*, 67–88. doi:10.1016/b978-0-444-64192-2.00004-4
- 6 Piligaev, A. V., K. N. Sorokina, A. V. Bryanskaya, E. A. Demidov, R. G. Kukushkin, N. A. Kolchanov, V. N. Parmov, and S. E. Pel'tek. “Research on the Biodiversity of Western Siberia Microalgae for Third-Generation Biofuel Production Processes.” *Russian Journal of Genetics: Applied Research* 3, no. 6 (2013): 487–92. <https://doi.org/10.1134/s2079059713060075>.
- 7 Biello, D. The false promise of biofuels // *Sci Am.* – 2011. – V. 305. – N. 2. – P. 58-65.
- 8 Kim, J., Yoo, G., Lee, H., Lim, J., Kim, K., Kim, C.W., Park, M.S., Yang, J.-W. Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae // *Biotechnology Advances.* – 2013. – V. 31. – N. 6. – P. 862-876.
- 9 Suriya Narayanan, G., kumar, G., Seepana, S., Elankovan, R., Arumugan, S., Premalatha, M. Isolation, identification and outdoor cultivation of thermophilic freshwater microalgae *Coelastrella* sp. FI69 in bubble column reactor for the application of biofuel production // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* – 2018. – V. 14. – N. – P. 357-365.
- 10 Zayadan, B.K., Akmukhanova, N.R., Sadvakasova, A.K., Collection of microalgae and method of their cultivation: Scientific and methodological manual - Almaty: Publishing house "Liter", 2013. - 158 p. ISBN 978-601-247-946-1.

- 11 Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294–306. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.02.001
- 12 Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review // *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. – 2010. – V. 14. – N. 1. – P. 217-232.
- 13 Niphadkar, S., Bagade, P., Ahmed, S. Bioethanol production: insight into past, present and future perspectives // *Biofuels*. – 2018. – V. 9. – N. 2. – P. 229-238
- 14 Suriya Narayanan, G., kumar, G., Seepana, S., Elankovan, R., Arumugan, S., Premalatha, M. Isolation, identification and outdoor cultivation of thermophilic freshwater microalgae *Coelastrella* sp. FI69 in bubble column reactor for the application of biofuel production // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. – 2018. – V. 14. – N. – P. 357-365.
- 15 Zhu, L.D., Li, Z.H., Hiltunen, E. Strategies for lipid production improvement in microalgae as a biodiesel feedstock // *BioMed Research International*. – 2016. – V. 2016. – P. 8.
- 16 Patil, L., Kaliwal, B. Effect of CO<sub>2</sub> concentration on growth and biochemical composition of newly isolated indigenous microalga *Scenedesmus bajacalifornicus* BBKLP-07 // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2017. – V. 182. – N. 1. – P. 335-348
- 17 Alam, F., Date, A., Rasjidin, R., Mobin, S., Moria, H., Baqui, A. Biofuel from algae - Is it a viable alternative? // *Procedia Engineering*. – 2012. – V. 49. – P. 221-227.
- 18 Sreenikethanam, A., Raj, S., J, R. B., Gugulothu, P., & Bajhaiya, A. K. Genetic Engineering of Microalgae for Secondary Metabolite Production: Recent Developments, Challenges, and Future Prospects. // *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. – 2022. – V. 10. – P. 7-9.
- 19 Ng, I. S., Tan, S. I., Kao, P. H., Chang, Y. K., & Chang, J. S. Recent Developments on Genetic Engineering of Microalgae for Biofuels and Bio-Based Chemicals // *Biotechnology journal*. – 2017. – V. 12. – P. 21-23.
- 20 Kim, J., Yoo, G., Lee, H., Lim, J., Kim, K., Kim, C.W., Park, M.S., Yang, J.-W. Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae // *Biotechnology Advances*. – 2013. – V. 31. – N. 6. – P. 862-876.
- 21 Abinandan, S., Shanthakumar, S. Challenges and opportunities in application of microalgae (Chlorophyta) for wastewater treatment: A review // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2015. – V. 52. – P. 123-132.
- 22 Berteotti, S., Ballottari, M., Bassi, R. Increased biomass productivity in green algae by tuning nonphotochemical quenching // *Sci Rep*. – 2016. – V. 6. – P. 21339.
- 23 Заядан Б.К., Акмуханова Н.Р., Садвакасова А.К. Коллекция микроводорослей и методы их культивирования: Научно-методическое пособие. – Алматы: Литер, 2013. – 158 с.

- 24 Klass L. Organic Commodity Chemicals from Biomass. Biomass for Renewable Energy // Fuels and Chemicals. 1998. P. 495-546.
- 25 Дворецкий Д. С., Дворецкий С. И., Темнов М. С. Технология получения липидов из микроводорослей. – Тамбов: ФГБОУ ВПО «ТГТУ», 2015. – 99 с.
- 26 Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor / L. Rodolfi, G.C. Zitelli, N. Bassi [et al.] // Biotech Bioeng 102. - 2009. - P. 100-112.
- 27 Gouveia, Luisa. Microalgae as a Feedstock for Biofuels. – Luisa Gouveia: Springer, 2011. – 69 p.
- 28 Ауджанова, В. К. Морфологические и систематические характеристики хлореллы. Ее производство и применение / В. К. Ауджанова // Научный вестник. – 2014. – № 1 (1). – С. 113 – 126.
- 29 Чернова, Н. И. Использование биомассы для производства жидкого топлива: современное состояние и инновации / Н. И. Чернова, Т. П. Коробкова, С. В. Киселева // Теплоэнергетика. – 2010. – № 11. – С. 28 – 35.
- 30 Арьянова Э. Д., Иванова С. С., Карпова О. С., Трофимчук О. А., Шевченко И. Г., Алексеев М. А., Коршунов К. О. Культиватор для выращивания хлореллы в искусственных условиях // Архитекторы будущего: сборник научных трудов Всероссийской научной школы по инженерному изобретательству, проектированию и разработке инноваций. – Томск: ТПУ, 2014 – 23 с.
- 31 Денищенко М.С. Исследование химического состава микроводоросли *Chlorella vulgaris* ИФР № С-111 и получение биодизельного топлива на ее основе: Выпускная квалификационная работа. – Барнаул, 2018. – 97 с.
- 32 Мещерякова Ю.В. Разработка технологического процесса получения биодобавок из липидных компонентов микроводоросли хлорелла для улучшения свойств дизельного топлива: Дис. уч. степ. кан. тех. наук. – Тамбов, 2016. – 157 с.
- 33 Ganesh Saratale, R., Ponnusamy, V. K., Jeyakumar, R. B., Sirohi, R., Piechota, G., Shobana, S., Dharmaraja, J., Lay, C. H., Dattatraya Saratale, G., Seung Shin, H., & Ashokkumar, V. Microalgae cultivation strategies using cost-effective nutrient sources: Recent updates and progress towards biofuel production // Bioresource technology. – 2022. – V. 361. – P. 217 – 219.
- 34 Algenol: Case study of an unsuccessful algae biofuels venture // BiofuelWatch. – 2017. – V. 1. – P. 5 – 10.
- 35 Algae ingredients - Accessing the original source of Omega-3 DHA // Corbion.com. – 2020.
- 36 Watson E. Solazyme rebrands as TerraVia, raises \$28m as part of plan to focus on food, nutrition, personal care: 'We're redefining the future of food' // Food Navifator. – 2024. – V. 7. – P. 14.

- 37 Directorate-General for Research and Innovation. Final evaluation of Horizon 2020 // European Commission. – 2024.
- 38 Coelho, D., Alfaia, C. M., Lopes, P. A., Pestana, J. M., Costa, M. M., Pinto, R. M. A., Almeida, J. M., Moreira, O., Fontes, C. M. G. A., & Prates, J. A. M. Impact of *Chlorella vulgaris* as feed ingredient and carbohydrases on the health status and hepatic lipid metabolism of finishing pigs // Research in veterinary science. – 2024. – V. 144, – P. 44–53.
- 39 Xi, L., Lu, Q., Liu, Y., Su, J., Chen, W., Gong, Y., Han, D., Yang, Y., Zhang, Z., Jin, J., Liu, H., Zhu, X., & Xie, S. Effects of fish meal replacement with *Chlorella* meal on growth performance, pigmentation, and liver health of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) // Animal nutrition. – 2022. – V 10. – P. 26 – 40.
- 40 Tsamesidis, I., Pappa, A., Charisis, A., Prentza, Z., Theocharis, K., Patsias, A., Foukas, D., Chatzidoukas, C., & Kalogianni, E. P. Impact of *Chlorella sorokiniana* feed additive on poultry growth health and oxidative stress in erythrocytes // Scientific reports. – 2022. – V. 14. – P. 14.
- 41 Skjånes, K., Aesoy, R., Herfindal, L., & Skomedal, H. Bioactive peptides from microalgae: Focus on anti-cancer and immunomodulating activity // Physiologia plantarum. – 2022. – V. 173. – P. 612–623.
- 42 Tan, J., Wang, X., Zhang, M., Meng, D., Hu, Y., Li, Y., Song, S., Wu, L., Sánchez, R. M. T., Fariás, M. E., & Xia, L. *Chlorella sorokiniana* FK-montmorillonite interaction enhanced remediation of heavy metals in tailings // The Science of the total environment. – 2023. – V. 876. – P. 263 – 267.
- 43 Kothari, R., Pandey, A., Ahmad, S., Singh, H. M., Pathak, V. V., Tyagi, V. V., Kumar, K., & Sari, A. Utilization of *Chlorella pyrenoidosa* for Remediation of Common Effluent Treatment Plant Wastewater in Coupling with Co-relational Study: An Experimental Approach // Bulletin of environmental contamination and toxicology. – 2022. – V. 108. – P. 12 – 16.
- 44 Chiu, S. Y., Kao, C. Y., Chen, C. H., Kuan, T. C., Ong, S. C., & Lin, C. S. Reduction of CO<sub>2</sub> by a high-density culture of *Chlorella sp.* in a semicontinuous photobioreactor // Bioresource technology. – 2008. – V. 99. – P. 76 – 77.
- 45 Lee, A. K. Microbial flocculation, a potentially low-cost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel / A. K. Lee, D. M. Lewis, P. J. Ashman // J Appl Phycol. – 2009. – N 21. – P. 559 – 567.
- 46 Мамедова Ф.Т. Различные подходы к накоплению биомассы микроводорослей *Chlorella vulgaris* и к процессам её биокаталитической трансформации: Дис. уч. степ. кан. тех. наук. – Москва, 2015. – 159 с.
- 47 Гафуров Н.М., Хисматуллин Р.Ф. Особенности производства биодизельного топлива из биомассы / Н.М. Гафуров, Р.Ф. Хисматуллин // Международный научный журнал “Инновационная наука”. 2016. №5. С 68-69.

- 48 Ubuy [Electronic resource]. – Photobioreactor. – Access mode: [https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.a.ubuy.com.kw%2Fen%2Fcatalog%2Fproduct%2Fview%2Fid%2F14276289%2Fs%2Fphotobioreactor-30-liter-for-home-cultivation-of-live-living-spirulina-algae&psig=AOvVaw2hq7H4ewRzK7csyl8UFs4H&ust=1622055353167000&source=images&cd=vfe&ved=0CA0QjhXqFwoTCIjHsYn\\_5vACFQAAAAAdAAAAABAM](https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.a.ubuy.com.kw%2Fen%2Fcatalog%2Fproduct%2Fview%2Fid%2F14276289%2Fs%2Fphotobioreactor-30-liter-for-home-cultivation-of-live-living-spirulina-algae&psig=AOvVaw2hq7H4ewRzK7csyl8UFs4H&ust=1622055353167000&source=images&cd=vfe&ved=0CA0QjhXqFwoTCIjHsYn_5vACFQAAAAAdAAAAABAM)
- 49 Aguoru C.U., Okibe P.O. Content and composition of lipid produced by *Chlorella vulgaris* for biodiesel production // Advances in Life Science and Technology. – Makurdi, 2015. – Vol.36.
- 50 Копытов Ю.П., Лелеков А.С., Геворгиз Р.Г., Нехорошев М.В., Новикова Т.М. Методика комплексного определения биохимического состава микроводорослей // Algologia. – Крым, 2015. –25(1): 35—40.
- 51 Yang F. A Novel Lipid Extraction Method from Wet Microalga *Picochlorum sp* at Room Temperature / F. Yang, W. Xiang, X. Sun // Marine Drugs. – 2014. – N 12. – P. 1258 – 1270.
- 52 Dahiya S., Chowdhury R., Tao W., Kumar P. Biomass and Lipid Productivity by Two Algal Strains of *Chlorella sorokiniana* Grown in Hydrolysate of Water Hyacinth // Energies 2021, 14, 1411.
- 53 McConnell, B. Kinetics Study of the Solvent Extraction of Lipids from *Chlorella vulgaris* / B. McConnell, I. H. Farag // International Journal of Engineering and Technical Research (IJETR). – 2013. – N 1(10). – P. 28 – 38.
- 54 Bhargavi G. Review on the Extraction Methods of Crude oil from all Generation Biofuels in last few Decades [Electronic resource]. – ResearchGate. – Access mode: [https://www.researchgate.net/figure/Soxhlet-extraction-apparatus-set-up-33\\_fig2\\_326734330](https://www.researchgate.net/figure/Soxhlet-extraction-apparatus-set-up-33_fig2_326734330)
- 55 Niphadkar, S., Bagade, P., Ahmed, S. Bioethanol production: insight into past, present and future perspectives // Biofuels. – 2018. – V. 9. – N. 2. – P. 229-238.
- 56 Adenle, A.A., Haslam, G.E., Lee, L. Global assessment of research and development for algae biofuel production and its potential role for sustainable development in developing countries // Energy Policy. – 2013. – V. 61. – P. 182-195.

**ОТЗЫВ**

**НАУЧНОГО РУКОВОДИТЕЛЯ**

на \_\_\_\_\_ магистерскую диссертацию \_\_\_\_\_  
(наименование вида работы)  
Оразғалиев Әлімжан Серікқалиұлы \_\_\_\_\_  
(Ф.И.О. обучающегося)  
7M05202 Биозэкологическая инженерия \_\_\_\_\_  
(шифр и наименование ОП)

Тема: Выделение липидов из микроводорослей для производства биодизельного топлива

Магистерская диссертация Оразғалиева Әлімжана посвящена актуальной научно-прикладной теме - разработке биотехнологических основ получения биодизельного топлива из микроводорослей. В условиях роста энергетического потребления и экологических ограничений тема работы имеет особую значимость как для фундаментальной науки, так и для прикладной экологии и энергетики.

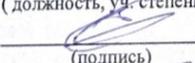
В работе успешно реализованы задачи по поиску, выделению и культивированию продуктивных штаммов микроводорослей, определению их липидного потенциала и сравнительному анализу. Экспериментальная часть выполнена на высоком методологическом уровне с применением современных биотехнологических методов, включая экстракцию липидов методом Сокслета. Результаты показывают, что штаммы *Chlorella vulgaris* (CH-1) и *Chlorella sp.* (CH-2) демонстрируют высокую эффективность по липидопродуктивности, что делает их перспективными объектами для дальнейших промышленных разработок.

Диссертация обладает новизной, практической значимостью и структурной логикой. Магистр проявил самостоятельность, высокую исследовательскую культуру и ответственность на всех этапах работы.

Считаю, что диссертационная работа Оразғалиева Әлімжана соответствует требованиям, предъявляемым к магистерским диссертациям, и заслуживает оценки «отлично» (95-100), а её автор — присвоения степени магистра естественных наук.

Научный руководитель

д.б.н., профессор \_\_\_\_\_  
(должность, уч. степень, звание)

 Еликбаев Б.К.  
(подпись)

«12» 06 2025 г.

**РЕЦЕНЗИЯ**

на \_\_\_\_\_ магистерскую диссертацию \_\_\_\_\_  
(наименование вида работы)

Оразгалиев Әлімжан Серікқалиұлы  
(Ф.И.О. обучающегося)

7M05202 Биоэкологическая инженерия  
(шифр и наименование ОП)

На тему: Выделение липидов из микроводорослей для производства биодизельного топлива

Выполнено:

- а) графическая часть на 13 листах  
б) пояснительная записка на 61 страницах

**ЗАМЕЧАНИЯ К РАБОТЕ**

Магистерская диссертация посвящена актуальной проблеме — поиску эффективных штаммов микроводорослей для получения биодизельного топлива как возобновляемого источника энергии. В работе рассмотрены ключевые этапы технологии - от отбора природных образцов до экстракции липидов и оценки продуктивности.

Автором обоснован выбор штаммов *Chlorella vulgaris* (CH-1) и *Chlorella sp.* (CH-2), которые показали высокий уровень липидоаккумуляции при культивировании в лабораторных условиях. Использование аппарата Сокслета позволило получить достоверные количественные показатели содержания липидов. Результаты имеют высокую практическую ценность в разработке биотехнологий устойчивого энергетического будущего.

Работа отличается логичностью структуры, ясностью изложения, достаточной иллюстративной базой и научной обоснованностью. Оформление соответствует требованиям. Вместе с тем, возможны улучшения в части более подробного анализа современных промышленных разработок и экономических аспектов применения биодизеля.

**Оценка работы**

Диссертация соответствует требованиям, предъявляемым к магистерским работам, и заслуживает высокой (95-100) оценки.

**Рецензент**

Декан факультета биологии и биотехнологии КазНУ им. аль-Фараби,

д.б.н., профессор

(должность, ученое звание)

Курманбаева М.С.  
(подпись)

Курманбаева М.С.

«16»

2025 г.

## Протокол

### о проверке на наличие неавторизованных заимствований (плагиата)

Автор: Оразғалиев Әлімжан Серікқалиұлы

Соавтор (если имеется):

Тип работы: Магистерская диссертация

Название работы: Выделение липидов из микроводорослей для производства биодизельного топлива

Научный руководитель: Бакытжан Еликбаев

Коэффициент Подобия 1: 9

Коэффициент Подобия 2: 4.7

Микропробелы: 10

Знаки из других алфавитов: 6

Интервалы: 0

Белые Знаки: 0

После проверки Отчета Подобия было сделано следующее заключение:

- Заимствования, выявленные в работе, является законным и не является плагиатом. Уровень подобия не превышает допустимого предела. Таким образом работа независима и принимается.
- Заимствование не является плагиатом, но превышено пороговое значение уровня подобия. Таким образом работа возвращается на доработку.
- Выявлены заимствования и плагиат или преднамеренные текстовые искажения (манипуляции), как предполагаемые попытки укрытия плагиата, которые делают работу противоречащей требованиям приложения 5 приказа 595 МОН РК, закону об авторских и смежных правах РК, а также кодексу этики и процедурам. Таким образом работа не принимается.
- Обоснование:

Дата 12.06.2025г.

Заведующий кафедрой Х.В.И.А.  
Кудекоба Ш.М. Куд

## Протокол

### о проверке на наличие неавторизованных заимствований (плагиата)

Автор: Оразгалиев Әлімжан Серікқалиұлы

Соавтор (если имеется):

Тип работы: Магистерская диссертация

Название работы: Выделение липидов из микроводорослей для производства биодизельного топлива

Научный руководитель: Бакытжан Еликбаев

Коэффициент Подобия 1: 9

Коэффициент Подобия 2: 4.7

Микропробелы: 10

Знаки из других алфавитов: 6

Интервалы: 0

Белые Знаки: 0

После проверки Отчета Подобия было сделано следующее заключение:

- Заимствования, выявленные в работе, является законным и не является плагиатом. Уровень подобия не превышает допустимого предела. Таким образом работа независима и принимается.
- Заимствование не является плагиатом, но превышено пороговое значение уровня подобия. Таким образом работа возвращается на доработку.
- Выявлены заимствования и плагиат или преднамеренные текстовые искажения (манипуляции), как предполагаемые попытки укрытия плагиата, которые делают работу противоречащей требованиям приложения 5 приказа 595 МОН РК, закону об авторских и смежных правах РК, а также кодексу этики и процедурам. Таким образом работа не принимается.
- Обоснование: *Заимствования правомерны и не влияют на самостоятельный характер работы*

Дата 12.06.2025г

*Ж.С. Карсенбаев С.О.* проверяющий эксперт

<https://doi.org/10.51301/SIC.2025.i1.41>

## Isolation of lipids from microalgae for the production of biodiesel

A. Orazgakiyev\*, B. Yelikbayev

Satbayev University, Almaty, Kazakhstan

\*Corresponding author: [alimzhan.oralgaliyev@gmail.com](mailto:alimzhan.oralgaliyev@gmail.com)

**Abstract.** The fuel derived from microalgae is a completely renewable energy resource and represents a comparable alternative to traditional hydrocarbon counterparts. Algae-based biodiesel fuel, produced through the photosynthesis of algae growing on CO<sub>2</sub>, has great potential as a biofuel. Seven water samples were taken from the Chundzha thermal spring, and a culture was subsequently obtained. Two species of microalgae were purified both algologically and bacteriologically. They were then cultivated in a photobioreactor. The dried microalgal biomass was extracted to isolate the lipid fraction. The quantitative determination of the lipid components of the microalgae was carried out using the Soxhlet extraction method.

**Keywords:** *microalgae, biodiesel production, lipid extraction.*

### 1. Введение

В связи с недавним увеличением мирового потребления энергии, добываемой из ограниченных запасов природных минеральных ресурсов, возрос интерес к альтернативным источникам энергии. Микроводоросли могут стать отличной альтернативой. Они обладают высокой скоростью воспроизводства и способностью накапливать значительное количество высокоэнергетических липидов благодаря высокой фотосинтетической активности [1]. Среди всех видов микроводорослей, используемых для массового культивирования, наиболее широко применяется *Chlorella* sp. Отличительной особенностью является её способность эффективно использовать световую энергию, а также химический состав клетки [2]. Использование микроводорослей отличается высокой энергетической эффективностью и низкой стоимостью. Биотопливо, полученное из микроводорослей, относится к биотопливу третьего поколения и требует меньших затрат энергии на производство, обеспечивая при этом более высокий экономический эффект [3]. Важными показателями эффективности использования микроводорослей являются высокая скорость роста (сохраняется в течение всего года) и высокое содержание липидов в клетках (до 70%), что значительно превышает аналогичные показатели у масличных растений (например, 30% у рапса). Они используются в качестве сырья для производства биодизеля и биомасляных продуктов [4]. По этой причине считается, что микроводоросли обладают огромным потенциалом для замены ископаемых видов топлива в будущем. Среди наиболее перспективных видов можно выделить *Chlorella* sp. (30-60% липидов), *Neochloris oleoabundans* (25-44%), *Nannochloropsis* sp. (31-68%), *Staphylococcus brucei* (25-85%) [5].

© 2025. A. Orazgakiyev, B. Yelikbayev

<https://conference.satbayev.university/>. Published by Satbayev University

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License

(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 2. Материалы и методы

Сбор образцов микроводорослей проводился летом 2023 года из термальных источников Чунджи. Пробы отбирались из одного и того же источника несколько раз, с различной глубины (не менее 5-10 см от поверхности водоёма). При сборе образцов все необходимые требования были соблюдены. Обогащенная культура – это культура, в которой преобладают представители одной физиологической группы или даже одного типа организмов. Для получения такой культуры создавались избирательные условия. С этой целью были подготовлены питательные среды BG-11, Zaruka и Tamiya.

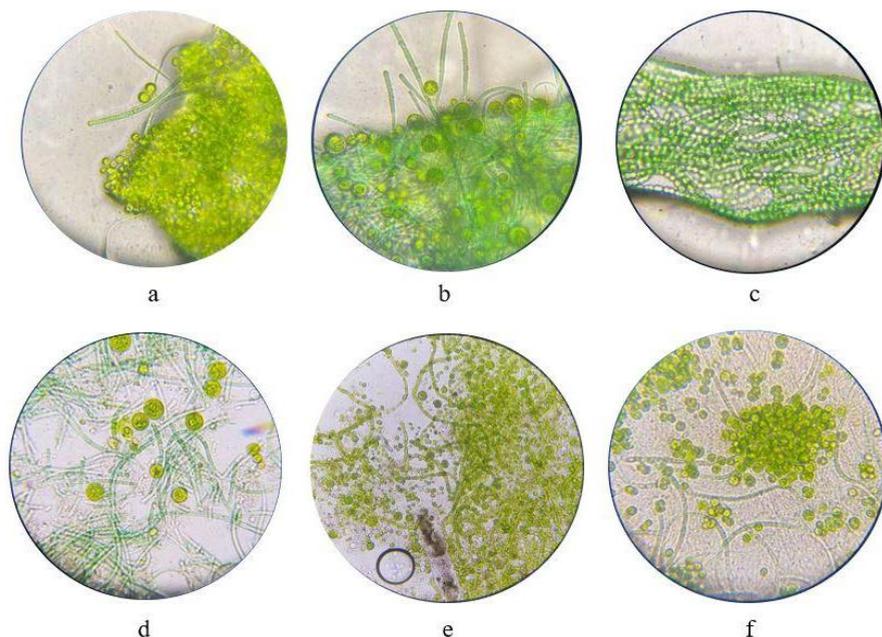
Целью исследования было определение оптимальных условий для роста микроводорослей *Chlorella vulgaris* (CH-1) и *Chlorella sp.* (CH-2) с высоким содержанием липидов для их дальнейшего использования в производстве биотоплива (рисунок 1).



Рисунок 1. Колбы с образцами *Chlorella*

## 3. Результаты и обсуждение

Процесс периодического культивирования биомассы микроводорослей *Chlorella* в технологии производства биотоплива третьего поколения состоит из двух периодов: накопление биомассы микроводорослей до концентрации 50-55 миллионов клеток/мл и выше. Культивирование при этих условиях проводилось в течение 10-12 дней. Были подготовлены 6 колб с обогащенной культурой. Поскольку образцы были собраны из различных мест, предполагалось, что они содержат разные виды микроорганизмов. В результате микроскопии были получены следующие изображения (рисунок 2):



**Рисунок 2. Микроорганизмы, содержащиеся в 6 обогащенных культурах**  
**a – Термальный источник Чунджи 1; b – Термальный источник Чунджи 2; c – Термальный источник Чунджи 3; d – Термальный источник Чунджи 4; e – Термальный источник Чунджи 5; f – Термальный источник Чунджи 6**

Как показано на изображении выше, обогащенные культуры состояли как из микроводорослей, так и из видов цианобактерий. Для идентификации каждого присутствующего организма проводился визуальный микроскопический контроль. Согласно проведённому анализу, были обнаружены следующие организмы: *Chlorella sp.*, *Anabaena*, *Nostoc sp.*, *Microcystis*, *Synechocystis*, *Chlamydomonas*, *Rivularia* и другие.

После исследования обогащенных культур на наличие микроорганизмов они были инокулированы в различные питательные среды с соблюдением всех асептических мер. Состав питательных сред подбирался в соответствии с предполагаемым альгологическим составом образцов. Клетки, полученные после сортировки или последовательного разведения, высевали на среду BG-11 с агаром, содержащую антибиотик флуконазол в концентрации 50 мкг/мл. Через 10-14 дней инкубации при температуре 25-30°C в среде отмечалось образование отдельных колоний микроводорослей. Проведение трех последовательных пересевов отдельных культурных колоний на среду BG-11 с агаром позволило получить чистые культуры микроводорослей. Чистота полученных культур микроводорослей была подтверждена отсутствием сопутствующей микрофлоры (бактерий и грибов). В результате были получены 2 чистых штамма.

Образец микроводорослей отбирался каждый день. 1 мл образца исследовался под микроскопом, а количество клеток подсчитывалось с помощью камеры Горяева. Объектом исследования были штаммы микроводорослей *Chlorella vulgaris* (СН-1) и *Chlorella sp.* (СН-2). В качестве питательной среды была выбрана среда Тамиа. Среда Тамиа используется в различных разведениях для культивирования микроводорослей. По химическому составу компонентов она содержит все необходимые элементы, необходимые для интенсивного размножения микроводорослей.

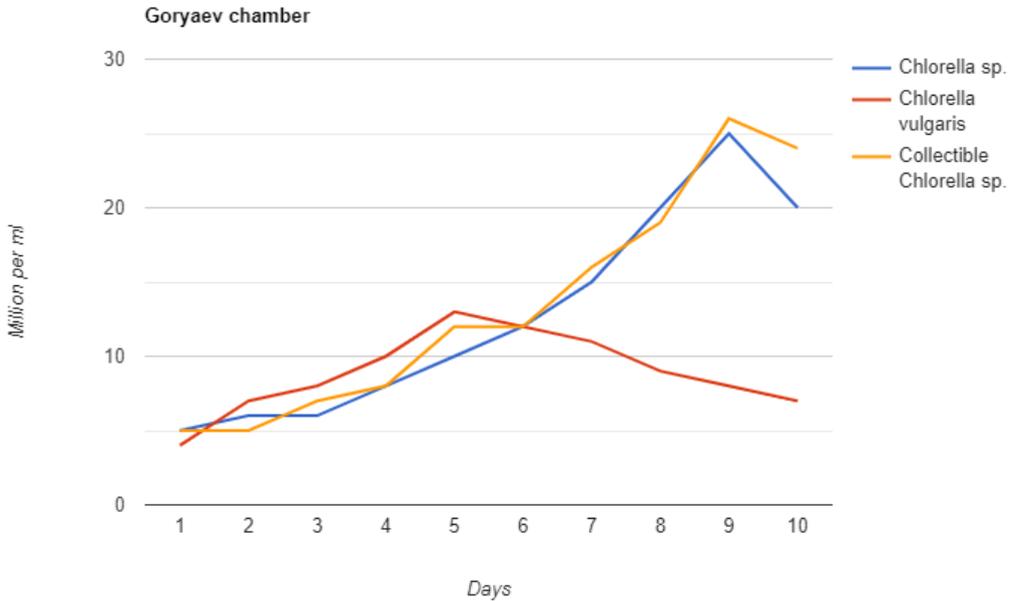


Рисунок 3. Скорость роста микроводорослей.

Оригинальные штаммы микроводорослей *Chlorella vulgaris* (CH-1) и *Chlorella sp.* (CH-2) использовались для инокуляции в стеклянные ёмкости с питательной средой, представленные в виде градуированных цилиндров. Стеклянные сосуды освещались светодиодной фитолампой. Инокулят для фотобиореактора составлял 20% от общего объёма суспензии.

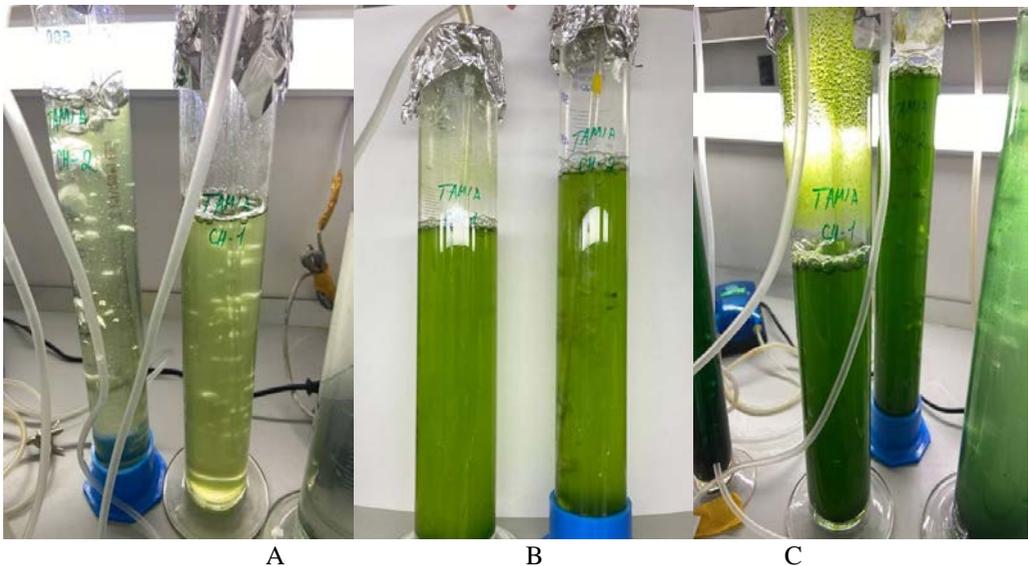


Рисунок 4. Производство биомассы в фотобиореакторах  
А- 1 день, В- 3-день, С-12-день.

Микроводоросли культивировались в фотобиореакторе объемом 500 мл в течение 12 дней. Температура культивирования поддерживалась на уровне 25° С. Определение продуктивности микроводорослей проводилось путем подсчета клеток культуры с использованием камеры Горяева. В течение первых 3 дней непрерывного культивирования концентрация клеток составляла 24,15 млн/мл в СН-1 и 38,77 млн/мл в СН-2. Через 3 дня клетки достигли концентрации 60,3 млн/мл в СН-1 и 78,26 млн/мл в СН-2. Средний прирост объема составил 35 млн/мл. После 12 дней культивирования биомасса была центрифугирована, высушена и взвешена. В результате было получено 12,4 г из СН-1 и 17,2 г из СН-2. Было проведено микроскопическое исследование образцов (рисунок 5).

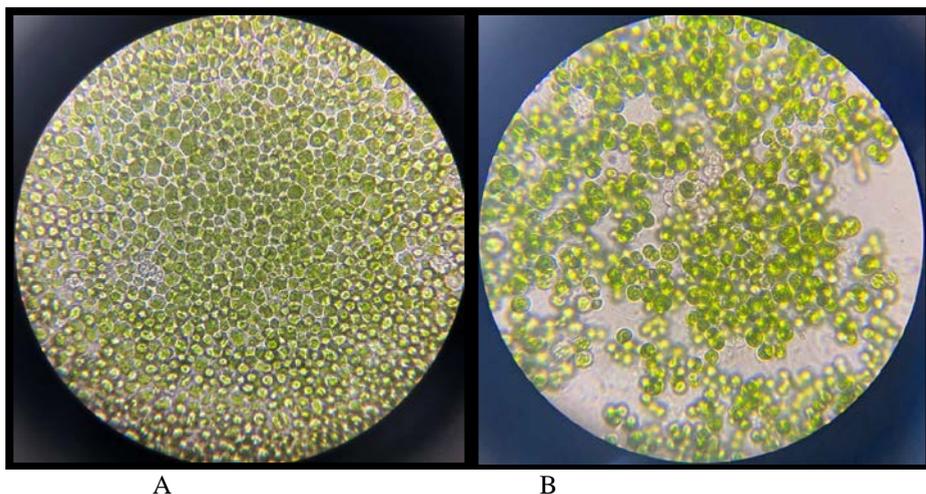


Рисунок 5. А-СН-1, В-СН-2

Суспензию необходимо несколько раз промывать чистой средой Тамиуа, после каждой процедуры промывки проводить центрифугирование. Биомасса концентрировалась методом центрифугирования. Полученная паста микроводорослей высушивалась до воздушно-сухого состояния в сушильном шкафу при температуре 40–45°С [6].

Извлечение липидов осуществляется методом прессования и экстракции. Более эффективной методикой по сравнению с прессованием является более практичный метод – экстракция. Экстракция представляет собой процесс извлечения компонентов из твердых или жидких веществ с использованием растворителя (экстрагента), который способен выборочно отделять только необходимые компоненты.

Экстракция проводилась в аппарате Сокслета. В экстрактор загружали 10 г пасты микроводорослей, во флягу заливали 60 мл экстрагента. В качестве экстрагента использовали раствор Фолча – смесь хлороформа и метанола в соотношении 2:1. Полученная мицелла переносилась в взвешенную колбу, после чего растворитель удаляли прессованием [7, 8, 9, 10]

После завершения экстракции полученные липиды рассчитываются, а процентное содержание липидов определяется с использованием математической формулы (1):

$$\text{Содержание липидов \%} = \frac{\text{масса(липиды в колбе)} - \text{масса(колба)}}{\text{масса(микроводоросли)}} * 10$$

1. Проба СН-1= 10 г  
 Пустая колба = 120 г  
 Колба с экстрагированным липидом = 122.921 г  
 Содержание липидов % =  $\frac{122.921-120}{10} * 100 = 29.21\%$
2. Проба СН-2 = 10 г  
 Пустая колба = 120 г  
 Колба с экстрагированным липидом = 123.713 г  
 Содержание липидов % =  $\frac{123.713-120}{10} * 100 = 37.13\%$



*Рисунок 6. Экстракция липидов в аппарате Сокслета.*

*Таблица 1. Содержание липидов в пробах.*

Пробы	Содержание липидов %
СН-1	29.21%
СН-2	37.13%
Среднее	33.17%

Определение продуктивности микроводорослей путем подсчета клеток культуры с использованием камеры Горяева показало более быстрый рост СН-2 по сравнению с СН-1. При экстракции липидов в аппарате Сокслета было установлено, что содержание липидов в СН-1 составляет 29,21%, тогда как в СН-2 – 37,13%. Учитывая их общее содержание липидов, можно утверждать, что СН-2, обладая более высоким содержанием липидов, является более выгодным вариантом для производства биодизеля. Клетки СН-2 крупнее и более продуктивны, что подтверждается высоким содержанием липидов. Клетки СН-1, напротив, меньше по размеру и менее продуктивны, что также привело к меньшему содержанию липидов. Это позволяет предположить, что созданные условия, вероятно, были более благоприятны для СН-2, чем для СН-1.

## Обсуждение

Результаты эксперимента демонстрируют, что микроводоросли, особенно штамм СН-2, обладают высоким потенциалом для производства биодизеля благодаря значительному содержанию липидов и высокой продуктивности. Применение современных методов культивирования (фотобиореакторы с LED-освещением) и экстракции (соклет-метод) позволяет обеспечить оптимальные условия для роста микроводорослей и повышения выхода целевого продукта.

Интеграция новейших методов, таких как анализ eDNA и метагеномика, может в дальнейшем способствовать более точной идентификации видов и оптимизации условий для их культивирования. Использование дистанционного зондирования и моделирования с применением алгоритмов машинного обучения также открывает перспективы для масштабирования производства биомассы на региональном и глобальном уровнях.

Кроме того, полученные данные позволяют рассматривать микроводоросли как эффективный источник возобновляемой энергии, способный не только заменить ископаемые виды топлива, но и снизить экологическую нагрузку на окружающую среду, поскольку их использование сопряжено с поглощением CO<sub>2</sub> в процессе фотосинтеза.

## 4. Выводы

Настоящее исследование демонстрирует, что микроводоросли, полученные из термальных источников Чунджи, являются перспективным сырьём для производства биодизельного топлива. Полученные результаты по культивированию, росту и содержанию липидов указывают на преимущество штамма СН-2, обладающего более высоким содержанием липидной фракции. Использование современных методов культивирования и экстракции позволяет оптимизировать технологический процесс и снижает затраты энергии, что является ключевым фактором в переходе к возобновляемым источникам энергии.

Дальнейшие исследования, включающие применение методов метагеномики, eDNA-анализа, дистанционного мониторинга и математического моделирования, позволят углубить понимание динамики микроводорослевых сообществ и оптимизировать производство биодизеля. Эти меры способствуют не только повышению экономической эффективности, но и экологической безопасности, что является важным условием устойчивого развития энергетического сектора.

## References

- [1] Khan, Muhammad Imran, Jin Hyuk Shin, and Jong Deog Kim. "The Promising Future of Microalgae: Current Status, Challenges, and Optimization of a Sustainable and Renewable Industry for Biofuels, Feed, and Other Products." *Microbial Cell Factories* 17, no. 1 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>.
- [2] Пилигаев А.В. Изоляция и изучение свойств штаммов микроводорослей-продуцентов липидов и их биокаталитическая переработка в биодизель.: кандидат биологических наук – Новосибирск, 2018. – 5 с.
- [3] Suriya Narayanan, G., kumar, G., Seepana, S., Elankovan, R., Arumugan, S., Premalatha, M. Isolation, identification and outdoor cultivation of thermophilic freshwater microalgae *Coelastrella* sp. F169 in bubble column reactor for the application of biofuel production // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. – 2018. – V. 14. – N. – P. 357-365.
- [4] Пилигаев А. В., К. Н. Сорокина, А. В. Брянская, Е. А. Демидов, Р. Г. Кукушкин, Н. А. Колчанов, В. Н. Пармов и С. Е. Пельтек. «Исследование биоразнообразия микроводорослей Западной Сибири для процессов производства биотоплива третьего поколения». *Российский журнал генетики: прикладные исследования* 3, № 6 (2013): 487–492. <https://doi.org/10.1134/s2079059713060075>.
- [5] Biello, D. The false promise of biofuels // *Sci Am*. – 2011. – V. 305. – N. 2. – P. 58-65.
- [6] Yang F. A Novel Lipid Extraction Method from Wet Microalga *Picochlorum* sp at Room Temperature / F. Yang, W. Xiang, X. Sun // *Marine Drugs*. – 2014. – N 12. – P. 1258 – 1270.
- [7] McConnell, B. Kinetics Study of the Solvent Extraction of Lipids from *Chlorella vulgaris* / B. McConnell, I. H. Farag // *International Journal of Engineering and Technical Research (IJETR)*. – 2013. – N 1(10). – P. 28 – 38.

- [8] Bhargavi G. Review on the Extraction Methods of Crude oil from all Generation Biofuels in last few Decades [Electronic resource]. –ResearchGate. – Access mode:  
[https://www.researchgate.net/figure/Soxhlet-extraction-apparatus-set-up-33\\_fig2\\_326734330](https://www.researchgate.net/figure/Soxhlet-extraction-apparatus-set-up-33_fig2_326734330)
- [9] Niphadkar, S., Bagade, P., Ahmed, S. Bioethanol production: insight into past, present and future = perspectives // *Biofuels*. – 2018. – V. 9. – N. 2. – P. 229-238.
- [10] Adenle, A.A., Haslam, G.E., Lee, L. Global assessment of research and development for algae biofuel production and its potential role for sustainable development in developing countries // *Energy Policy*. – 2013. – V. 61. – P. 182-195.

## Биодизель отынын өндіру үшін микробалдырлардан липидтердің бөлінуі

Ә.С. Оразғалиев\*, Б.К. Еликбаев

*Қ.И. Сәтбаев атындағы Қазақ ұлттық техникалық зерттеу университеті, Алматы, Қазақстан*

\*Корреспонденция үшін автор: [alimzhan.orazgaliyev@gmail.com](mailto:alimzhan.orazgaliyev@gmail.com)

**Аңдатпа.** Микробалдырлар негізінде алынған отын толықтай жаңартылатын энергетикалық ресурс болып табылады және дәстүрлі көмірсутекті баламаларға лайықты альтернатива ретінде қарастырылады. СО<sub>2</sub>-да өсетін балдырлардың фотосинтезі негізінде өндірілетін биодизель отыны биожанармай ретінде үлкен әлеуетке ие. Чунджадағы термалды қайнар көзінен жеті су сынамасы алынып, кейіннен мәдениет өсірілді. Микробалдырлардың 2 түрі альгологиялық және бактериологиялық тұрғыдан тазартылды. Содан кейін фотобиореакторда өсірілді. Кептірілген микробалдырлар биомассасы липидтік фракцияны бөліп алу үшін экстракцияланды. Микробалдырлардың липидтік құрамын сандық анықтау Сокслет экстракция әдісімен жүргізілді.

**Негізгі сөздер:** микробалдырлар, биодизель отынын өндіру, липидтерді бөлу.

## Выделение липидов из микроводорослей для производства биодизельного топлива

Ә.С. Оразғалиев\*, Б.К. Еликбаев

*Казахский национальный исследовательский технический университет имени К.И. Сатпаева, Алматы, Казахстан*

\*Автор для корреспонденции: [alimzhan.orazgaliyev@gmail.com](mailto:alimzhan.orazgaliyev@gmail.com)

**Аннотация.** В условиях растущего мирового спроса на энергию и исчерпания запасов ископаемого топлива, альтернативные источники энергии приобретают особую актуальность. Топливо, получаемое из микроводорослей, представляет собой полностью возобновляемый ресурс с высоким потенциалом для производства биодизельного топлива. В данной работе проведено выделение липидной фракции из микроводорослей, полученных из термальных источников Чунджи, с целью оптимизации процесса получения сырья для биодизеля. Используя методы альгалической и бактериологической очистки, культивирование в фотобиореакторе и последующую экстракцию липидов методом Сокслета, получены два штамма микроводорослей, отличающиеся содержанием липидов 29,21% и 37,13% соответственно. Результаты исследования демонстрируют, что штамм с более высоким содержанием липидов (СН-2) обладает большим потенциалом для дальнейшего масштабирования производства биодизеля.

**Ключевые слова:** микроводоросли, биодизельное топливо, липиды, экстракция, фотобиореактор.