

Стресс-индуцированное производство ценных органических соединений штаммами пресноводных микроводорослей

Джибу Томас*, Далия Джозеф, Пандиан Сурешкумар

Лаборатория исследований биомассы водорослей, отделение биотехнологии,
Карунский научно-технологический институт,
Коимбатур 641114, Тамилнад, Индия
*jibuthomas.t@gmail.com

Поступила в редакцию 25.11.2019. После доработки 20.01.2020

Подписана в печать 25.03.2020. Опубликована 24.09.2020

Реферат

Исследовано влияние дефицита питательных веществ в среде культивирования на биомассу и продукцию липидов штаммами пресноводных микроводорослей *Grasiella* sp. и *Chlorella* sp. Микроводоросли известны как потенциальный источник для производства биодизеля и различных ценных биоактивных соединений. Они быстро наращивают биомассу, синтезируют и накапливают большое количество (20–50% сухой биомассы) нейтральных липидов, преимущественно в форме триацилглицерина. Наращивание водорослевой биомассы, а также увеличение выработки липидов и каротиноидов может быть достигнуто путем стимулирования через стресс, вызванный лимитированием различных факторов окружающей среды. Культуры выращивали в двух вариантах среды: с нормальным и лимитированным содержанием питательных веществ. Стресс был вызван недостатком азота и фосфора в питательной среде. Показано, что выход биомассы в условиях лимитирования питательных веществ в среде культивирования был выше, чем в нормальных условиях. Концентрация сухой биомассы хлореллы, выращенной в нормальных и стрессовых в условиях дефицита нутриентов, составляет 0,78 и 0,96 г/л соответственно, штамма *Grasiella* sp. – 0,48 и 0,8 г/л соответственно. По данным Фурье-ИК анализа, ограничение питательных веществ в среде влияет на состав биомолекул в клетках микроводорослей, но реакция исследованных штаммов на стресс была разной. Общее содержание липидов в биомассе (1 г сухой биомассы) штамма *Grasiella* sp. КАСС 19 в нормальных (0,0131 г/л) и лимитированных (0,0765 г/л)

© Джибу Томас, Далия Джозеф, Пандиан Сурешкумар, 2020

условиях было значительно ниже, чем у *Chlorella* sp. КАСС 21 – 0,1125 и 0,2178 г/л соответственно. Профилирование выявило наличие насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот и их накопление клетками хлореллы в условиях лимитирования питательных веществ в среде, что позволяет использовать этот штамм в качестве потенциального сырья для производства биотоплива.

К л ю ч е в ы е с л о в а : микроводоросли, лимитирование питательных веществ, биодизель, липиды, биомолекулы

Введение

Микроводоросли считаются потенциально важными организмами для устойчивого развития окружающей среды. Помимо биоремедиации и связывания углерода они способны производить значительные количества липидов, которые могут превращаться в биодизель и другие побочные продукты (McGinn et al., 2011; Rawat et al., 2011). Простые требования к условиям культивирования, высокая скорость роста, быстрое наращивание биомассы, способность расти на любой питательной среде, высокая фотосинтетическая способность делают микроводоросли полезным источником сырья для производства биотоплива. При эффективном использовании питательных веществ микроводоросли могут стать перспективным объектом биоэнергетики. Ключевыми факторами экономической целесообразности крупномасштабного производства биотоплива из микроводорослей являются скорость наращивания биомассы и липидная продуктивность микроводорослей (Fan et al., 2014). Регулируя подачу питательных веществ и условия культивирования, можно легко модифицировать биохимический состав микроводорослей, чтобы получить из биомассы более высокий выход желаемых биомолекул (Procházková et al., 2014). В оптимальных условиях микроводоросли могут быстро наращивать биомассу, но содержание липидов в ней обычно низкое, составляя у разных штаммов от 5 до 20% сухой биомассы (Sharma et al., 2012). Стрессы, связанные с такими условиями культивирования, как доступность азота и фосфора, соленость среды и режим освещенности, широко используют для повышения уровня накопления липидов в биомассе (70–90% сухой биомассы) путем изменения способа поглощения углерода и накопления энергии в клетках в виде масла (Cheng, He, 2014; Minhas et al., 2016).

Доступность питательных веществ имеет большое значение для роста микроводорослей, а влияние дефицита питательных веществ на накопление липидов клетками микроводорослей было отмечено в разных литературных источниках (Courchesne et al., 2009; Deng et al., 2011). Изучена также стратегия двухстадийного метода культивирования с азотом, при котором микроводоросли сначала выращивали в условиях, богатых азотом, а затем переносили в среду без него, что позволило получить высокое содержание липидов при незначительной потере

биомассы (Chen et al., 2011). Исследования показали, что промежуточные дозы азота также приводят к более высокой выработке биомассы и липидов, чем при азотном голодании (Ordog et al., 2012).

В данной работе исследовано влияние дефицита азота и фосфора на выработку липидов клетками пресноводных микроводорослей *Chlorella* sp. KACC 21 и *Grasiella* sp. KACC 19, а также описаны производимые этими штаммами биоактивные соединения с перспективой их использования в биотехнологии, в т. ч. для нужд пищевой промышленности.

Материалы и методы

Культуры микроводорослей и условия роста

Материалом для исследования служили культуры штаммов пресноводных микроводорослей *Grasiella* sp. KACC 19 и *Chlorella* sp. KACC 21, хранящиеся в лаборатории исследования биомассы водорослей Карунского научно-технологического института. Штаммы культивировали на питательных средах такого состава (Pauline, Achary, 2018): Na_2HCO_3 – 4,5 г/л, K_2HPO_4 – 0,5 г/л, NaNO_3 – 1,5 г/л, NaCl – 1,0 г/л, $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2 г/л, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,04 г/л, $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.018 г/л, K_2SO_4 – 1,0 г/л. Культуры периодически контролировали в световом микроскопе (Accuscope, США) и поддерживали частыми пересевами. Штаммы выращивали в помещении для культивирования водорослей при 28 ± 2 °С, интенсивности света 1500–2500 лк в режиме свет : темнота 12 : 12 ч.

Схема эксперимента по изучению влияния стресса на продукционные характеристики биомассы

Стресс микроводорослей от дефицита питательных веществ индуцировали, ограничивая концентрацию азота и фосфора в питательной среде (стрессовая среда) до 25% исходной концентрации (нормальная среда). Кроме меньших доз азота (NaNO_3 – 0,375 г/л) и фосфора (K_2HPO_4 – 0,125 г/л), остальные составляющие стрессовой среды были такими же, как в нормальной среде. Культуры, достигшие в нормальной среде ранней стационарной фазы роста, инокулировали в стрессовую питательную среду. Затем оба варианта культур микроводорослей (нормальные и с лимитированными питательными веществами) культивировали в 20-литровых аквариумах на открытом воздухе, обеспечивая аэрацию 1 ч/день и температуру приблизительно 30 °С в режиме свет : темнота 12 : 12 ч. Биомассу культур двух вариантов культивирования использовали для дальнейших аналитических исследований.

Отбор биомассы

В эксперименте использовали культуры, находящиеся на поздней экспоненциальной фазе роста, и культивируемые как в нормальных условиях, так и в среде с дефицитом азота и фосфора. Отбор проводили двухстадийным методом флокуляции с использованием 10% квасцов

(алюмосульфат калия) с последующим центрифугированием. Культурам из 20-литровых емкостей давали отстояться, затем обезвоживали до меньшего объема и центрифугировали при 5000 об/мин. Полученную биомассу сушили в печи и измеряли сухой вес биомассы.

Определение биохимического состава микроводорослей с использованием метода ИК-Фурье спектроскопии (FT-IR)

Биохимический состав биомассы после ее центрифугирования и высушивания анализировали методом FT-IR спектроскопии (Wagner et al., 2010). ИК-Фурье-спектры регистрировали с помощью инфракрасного спектрометра Nicolet-Avatar-360, снабженного дейтерированным триглицидным сульфатом с воздушным охлаждением и продуванием азотом. Спектры регистрировали в диапазоне $4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$ с разрешением 4^{-1} путем объединения 50 сканов. Анализировали спектры с использованием программного обеспечения ORIGIN 6.0 (OriginLab Corporation, Массачусетс, США) (Sureshkumar et al., 2017). Полосы были отнесены к определенным молекулярным группам на основе биохимических стандартов и литературным данным (Stehfest et al., 2005). Биохимический состав этих молекул изучался на основе площади пиков и интенсивности спектров, которые непосредственно связаны с концентрацией биомолекул. Общая концентрация липидов была рассчитана с использованием четырех областей спектра: 2960 см^{-1} (CH_3 асимметричное растяжение липидов), 2923 см^{-1} (CH_2 асимметричное растяжение липидов), 2852 см^{-1} (CH_2 симметричное растяжение липидов) и 1743 см^{-1} (C-O растяжение сложного эфира триглицеридов). Концентрацию белка оценивали в трех областях по N-H растяжению/O-H растяжению амида A при 3450 см^{-1} , C-O растяжению амида I при 1654 см^{-1} и N-H изгиб, C-N растяжению амида II при 1543 см^{-1} . Содержание углеводов рассчитывали при области спектра 1074 см^{-1} , а нуклеиновых кислот – при 1244 см^{-1} .

Содержание липидов и продуктивность биомассы

Клетки микроводорослей разрушали с помощью ультразвука. Два грамма высушенной биомассы добавляли к 100 мл хлороформа и метанола (2 : 1), затем подвергали ультразвуковой обработке при 40 кГц в течение 20 мин. Общие липиды извлекали методом Блая и Дайера (Bligh, Dyer, 1959) с небольшими модификациями. Два грамма сухой биомассы водорослей (W1) смешивали со смесью хлороформ : метанол в соотношении 1 : 2, гомогенизировали с использованием вихря в течение 2 мин и инкубировали при комнатной температуре на протяжении 24 ч. Гомогенизированную смесь центрифугировали при $4000 \times g$ в течение 10 мин, затем супернатант переносили в предварительно взвешенный флакон (W2). Экстракцию повторяли трижды, супернатанты объединяли, сушили при $70\text{ }^\circ\text{C}$ и взвешивали, получая W3. Содержание липидов (LC, %) измеряли гравиметрически и рассчитывали по формуле:

$$\text{LC (\% сухой биомассы)} = (W3 - W2) / W1 \times 100.$$

Продуктивность липидов (мг/л/день) = содержание липидов (%) × продуктивность биомассы.

Профилирование жирных кислот

Профиль жирных кислот липидов анализировали на газовом хроматографе Clarus 680 (Perkin Elmer, США), оборудованном автоматическим пробоотборником и оснащенном детектором ионизации пламени согласно протоколу, описанному Ma et al. (2014). Метилловые эфиры жирных кислот идентифицировали путем сравнения со временем удерживания определенных стандартов (Sigma, Сент-Луис, США). Пики определяли на основе эталонных стандартов, а также библиотеки NIST11 и Wiley 9.

Статистический анализ

Эксперименты были проанализированы, исходя из результатов замеров, в трех повторностях. Указанные значения представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение трех значений с использованием Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft, США).

Результаты и обсуждение

Влияние лимитирования питательных веществ на продуктивность биомассы

Биомасса микроводорослей рассматривается в качестве возможного исходного сырья для производства биотоплива и ее низкая производительность является основной технической проблемой при планировании промышленного производства. Продуктивность микроводорослей с точки зрения биомассы, липидов и углеводов увеличивается в результате изменения условий роста и культивирования (Procházková et al., 2014). Азот и фосфор являются важными элементами метаболизма микроводорослей, которые играют важную роль в синтезе многих биологических макромолекул и энергетическом обмене (Cai et al., 2013; Gonçalves et al., 2017). В данном исследовании для получения биомассы штаммы *Grasiella* sp. KACC 19 и *Chlorella* sp. KACC 21 выращивали на богатой питательной среде, содержащей NaNO_3 (1,5 г/л) и K_2HPO_4 (0,5 г/л). Затем культуры переносили в среду с ограниченным содержанием нитратов и фосфатов (NaNO_3 – 0,375 г/л; K_2HPO_4 – 0,125 г/л), чтобы выяснить, сможет ли дефицит азота и фосфора повлиять на максимальную биомассу и липидную продуктивность.

Влияние дефицита питательных веществ на количество и продуктивность биомассы (в сухой биомассе, с.б.) микроводорослей *Grasiella* sp. KACC 19 и *Chlorella* sp. KACC 21 показано в табл. 1. Установлено, что с уменьшением концентрации нитратов и фосфатов в питательной среде содержание биомассы увеличивается. Наибольшее ее количество обнаружено у *Chlorella* sp. KACC 21 0,98 г с.б./л, что

свидетельствует о том, что лимитирование питательных веществ приводит к накоплению биомолекул в клетках, и тем самым – к увеличению биомассы. Та же тенденция наблюдалась в отношении продуктивности биомассы – в условиях дефицита питательных веществ продуктивность увеличивалась. Это значит, что ограничение питательных веществ в питательной среде может быть эффективным для поддержания достаточного темпа наращивания биомассы для производства биотоплива.

Наше исследование показало, что в отличие от полного истощения питательных веществ в среде, их частичное лимитирование приводит к увеличению биомассы микроводорослей в таких стрессовых условиях. Это согласуется с выводами других авторов, которые также наблюдали увеличение биомассы штаммов *Chlorella minutissima* (Ördög et al., 2012) и *Scenedesmus* sp. CCNM 1077 при культивировании на среде с частично редуцированной концентрацией азота (Pancha et al., 2014).

Влияние дефицита питательных веществ на выработку липидов

Накопление липидов происходит в случае возникновения избытка фиксированной энергии, образованной в результате фотосинтеза. Избыток энергии, который больше не может использоваться для роста клетки, она преобразует в липиды для обеспечения энергией в периоды метаболического дисбаланса (Lacour et al., 2012). Имеются сведения о том, что среднее содержание липидов в клетках диатомовых и других микроводорослей, в т.ч. зеленых, в условиях насыщения среды питательными веществами составляет 11–51% (в среднем 25% с.б.) (Griffith, Harrison, 2009). В условиях оптимальной концентрации азота в среде содержание липидов в клетках обычно составляло от 20 до 30% с.б., а в условиях N-депривации у многих зеленых водорослей наблюдалось увеличение содержания липидов в биомассе на 18–64%. Мы установили, что количество липидов, продуцируемых штаммом *Grasiella* sp. KACC 19 в нормальных условиях и с ограниченными питательными веществами, составляет 0,0131 и 0,0765 г/л соответственно, тогда как в случае *Chlorella* sp. KACC 21 липидная продуктивность клеток существенно выше – 0,1125 и 0,2178 г/л соответственно (см. табл. 1).

Выращивание штамма *Chlorella* sp. KACC 21 на питательной среде с меньшими концентрациями биогенов привело к двукратному увеличению содержания липидов (43,56% с.б.) по сравнению с содержанием липидов (22,5% с.б.) в биомассе, выращенной на оптимальной питательной среде. Липидная продуктивность штамма *Chlorella* sp. KACC 21 в нормальных и стрессовых условиях составляла 1,46 и 3,48 мг/л/сут соответственно (см. табл. 1). Li et al. (2008) отмечали, что *Neochloris oleobundans*, выращенный на среде с 5 мМ нитрата натрия, имеет более высокую липидную продуктивность по сравнению с 3 мМ нитрата натрия в среде культивирования. Однако в случае со штаммом *Grasiella* sp. KACC 19 было обнаружено, что содержание липидов в биомассе, выращенной на среде с частичным уменьшением содержания питательных веществ

составляет 15% с.б., что незначительно по сравнению со штаммами других изученных зеленых водорослей. Наши результаты согласуются с данными других исследователей (Griffith, Harrison, 2009), которые сообщили, что штаммы микроводоросли по-разному реагировали на стресс дефицита питательных веществ: у одного штамма липиды составляли менее 10% с.б., а другие содержали 40–50% липидов.

Таблица 1. Продуктивность штаммов *Grasiella* sp. КАСС 19 и *Chlorella* sp. КАСС 21 при росте в нормальных и стрессовых (дефицит N и P) условиях культивирования*

Среда	Биомасса, г/л	Прирост биомассы, мг/л/сут	Липиды, %	Липидная продуктивность, мг/л/сут
<i>Grasiella</i> sp. КАСС 19				
Нормальная	0,47 ± 0,015	0,042 ± 0,002	2,58 ± 0,02	0,104 ± 0,001
Стрессовая	0,83 ± 0,04	0,0669 ± 0,001	15,38 ± 0,035	1,017 ± 0,002
<i>Chlorella</i> sp. КАСС 21				
Нормальная	0,78 ± 0,005	0,064 ± 0,001	22,56 ± 0,065	1,48 ± 0,034
Стрессовая	0,96 ± 0,02	0,082 ± 0,002	43,54 ± 0,043	3,48 ± 0,015

* Приведено среднее значение ± стандартное отклонение трех измерений.

Влияние ограничения питательных веществ в среде на биохимический состав штаммов

Для наблюдения биомолекул и метаболических изменений в клетках микроводорослей после уменьшения содержания питательных веществ в среде культивирования мы использовали анализ FT-IR спектров. Спектры, полученные для образцов биомассы, выращенной в нормальных и стрессовых условиях, сравнивали со спектрами биомолекул (рис. 1). Результаты показали, что 9 различных полос поглощения по волновому числу 4000–400 см⁻¹ с резкими отличиями в спектрах биомассы, выращенной в нормальных и лимитированных по питательным веществам условиях, соответствуют 4 областям липидов, 3 областям для белков, 1 области для полисахаридов и 1 – для нуклеиновых кислот (табл. 2).

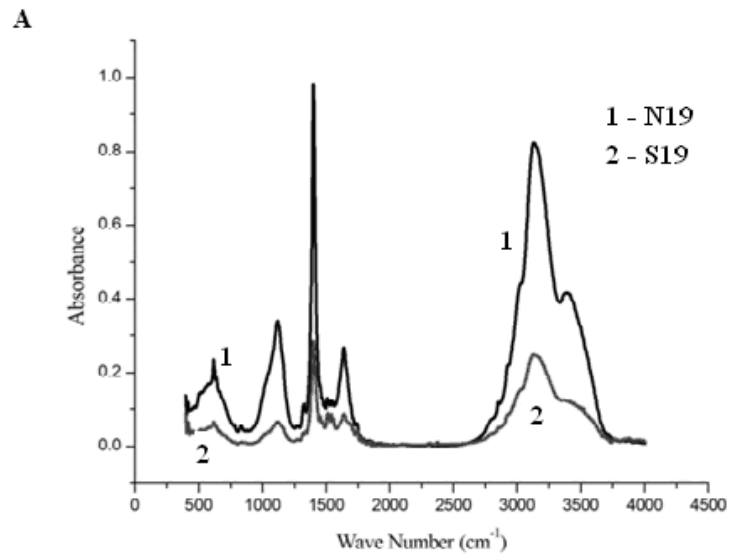
Влияние лимитирования питательных веществ на состав биомолекул и содержание липидов, белков и углеводов представлено в FT-IR спектрах на рис. 1. Судя по FT-IR спектрам *Chlorella* sp. КАСС 21, в условиях дефицита нутриентов штамм имел высокое содержание липидов и белков. Так, в условиях стресса общее содержание белка увеличилось в 3,27 раза, а содержание липидов было в 2,62 раза выше, чем в нормальных условиях культивирования. Штамм *Grasiella* sp. КАСС 19 иначе реагировал на стресс со стороны питательных веществ, демонстрируя более высокое содержание биомолекул в нормальных условиях, чем при ограничении питательных веществ в среде.

Таблица 2. Биомолекулярный состав биомассы штаммов *Grasiella* sp. КАСС 19 и *Chlorella* sp. КАСС 21 в нормальных (N) и стрессовых (NL) условиях

Длина волны, см ⁻¹	Назначение группы	Условия, штамм			
		N19	NL19	N21	NL21
3128,54	N-H растяжение / O-H растяжение амида А белка	93,24354	37,961	0,31098	1,60039
2924,085	CH ₂ асимметричное растяжение липидов	0,78143	0,25529	0,23842	0,38605
2852,719	CH ₂ симметричное растяжение липидов	0,40656	0,16637	0,35037	0,22001
1745,578	C-O растяжение сложного эфира триглицеридов	0,42105	0,33391	0,11243	0,16162
3142,041	CH ₃ асимметричное растяжение липидов	271,4162	17,09828	11,82343	48,05484
1639,494	C-O растяжение амида I белка	11,47874	2,94398	4,54444	6,19587
1514,121	N-H изгиб, C-N растяжение амида II белка	0,4304	1,7842	0,59826	1,22977
1116,784	C-O растяжение полисахаридов	39,6059	6,99154	14,38182	19,97159

Содержание общих липидов в клетках, выращенных в нормальных условиях, было в 4,013 раза выше, чем в состоянии стресса. Аналогично, количество белков, полисахаридов и триглицеридов, продуцируемых в нормальных условиях, было выше в 6,48; 1,24 и 5,63 раза соответственно.

В нашем исследовании уменьшение содержания нитратов и фосфатов в питательных средах значительно снизило содержание общего белка в биомассе штамма *Grasiella* sp. КАСС 19. Измерения концентрации общего белка в образцах микроводорослей выявили незначительное изменение у *Chlorella* sp. КАСС 21 в ответ на лимитирование азота и резкое изменение у *Grasiella* sp. КАСС 19 – рост в 6,48 раза по сравнению с нормальными условиями. Эти результаты согласуются с литературными данными. Джордано с соавт. (Giordano et al., 2001) наблюдали в условиях N-голодания значительное снижение общего белка в клетках морской диатомовой водоросли *Chaetoceros muellerii*. Также сообщалось (Dean et al., 2010), что при культивировании штаммов *Chlamydomonas reinhardtii* и *Scenedesmus subspicatus* в ограниченных по N условиях обнаружено снижение общего белка на 11 и 9% соответственно по сравнению с нормальными условиями.



B

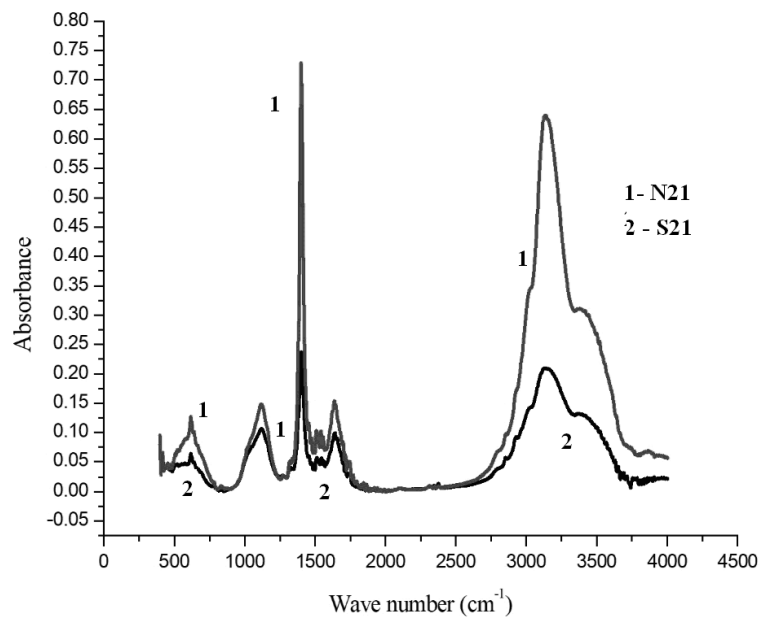


Рис. 1. FT-IR спектры штаммов *Grasiella* sp. KACC 19 (A) и *Chlorella* sp. KACC 21(B) при лимитировании питательных веществ в среде

Клетки микроводорослей в условиях стресса наиболее часто запасают липиды и углеводы (Courchesne et al., 2009). Как видно из рис. 1, снижение концентрации нитратов и фосфатов в питательной среде значительно повышало содержание липидов и углеводов в биомассе штаммов *Grasiella* sp. КАСС 19 и *Chlorella* sp. КАСС 21. Так, общее содержание липидов и углеводов в *Chlorella* sp. в стрессовых условиях увеличилось в 2 и 1,3 раза соответственно. Полученные результаты также показывают, что снижение концентрации нитратов и фосфатов в культивационной среде имеет положительную корреляцию с содержанием клеточных липидов и углеводов. Подобная тенденция в накоплении липидов наблюдалась также у *Chlorella minutissima* (Ördög et al., 2012). Наше исследование показало, что для повышения липидной продуктивности клеток микроводорослей ограничение питательных веществ в процессе культивирования более эффективно, чем полное голодание; при этом следует учесть, что продуктивность зависит от вида водорослей.

Профиль жирных кислот исследованных штаммов микроводорослей в нормальных и стрессовых условиях

Результаты профилирования жирных кислот штамма *Chlorella* sp. КАСС 21 в нормальных и стрессовых условиях представлены на рис. 2. Как видно из рисунка, оба профиля показали присутствие в клетках хлореллы насыщенных, мононенасыщенных (MUFA), полиненасыщенных (PUFA) жирных кислот и углеводов. Из жирных кислот наиболее обильно в биомассе хлореллы, выращенной как в нормальных, так и стрессовых условиях, представлен α -линоленат (C18:3). В условиях лимитирования нитратов и фосфатов наиболее обильно представлены насыщенные и мононенасыщенные жирные кислоты: эйкозановая (C20:0), олеиновая (C18:1), фталевая и октановая.

Интересно, что в стрессовых условиях клетки также запасали некоторое количество эйкозапентаеновой и докогексаеновой кислот. Эти результаты согласуются с выводами Bélanger-Lépine et al. (2018), которые сообщили, что фосфатный стресс оказал положительное влияние на выработку липидов. Выращенная в дефицитных по фосфору условиях *Chlorella* sp. содержала более высокие количества олеиновой (C18:1 (9 *цис*-9) и линоленовой (C18:3 (3 *цис*-9,12,15) жирных кислот, чем контроль. По нашим данным, в стрессовых условиях клетки хлореллы также накапливали углеводы, как например, нонадекан, неофитадиен, пентадеканон и докозен (табл. 3). В то же время в нормальных условиях выявлены более высокие количества таких полиненасыщенных жирных кислот, как гексадекановая, пентадекановая, гексадекатриеновая, эйкозатетраеновая, докозагексаеновая и др. (см. табл. 3).

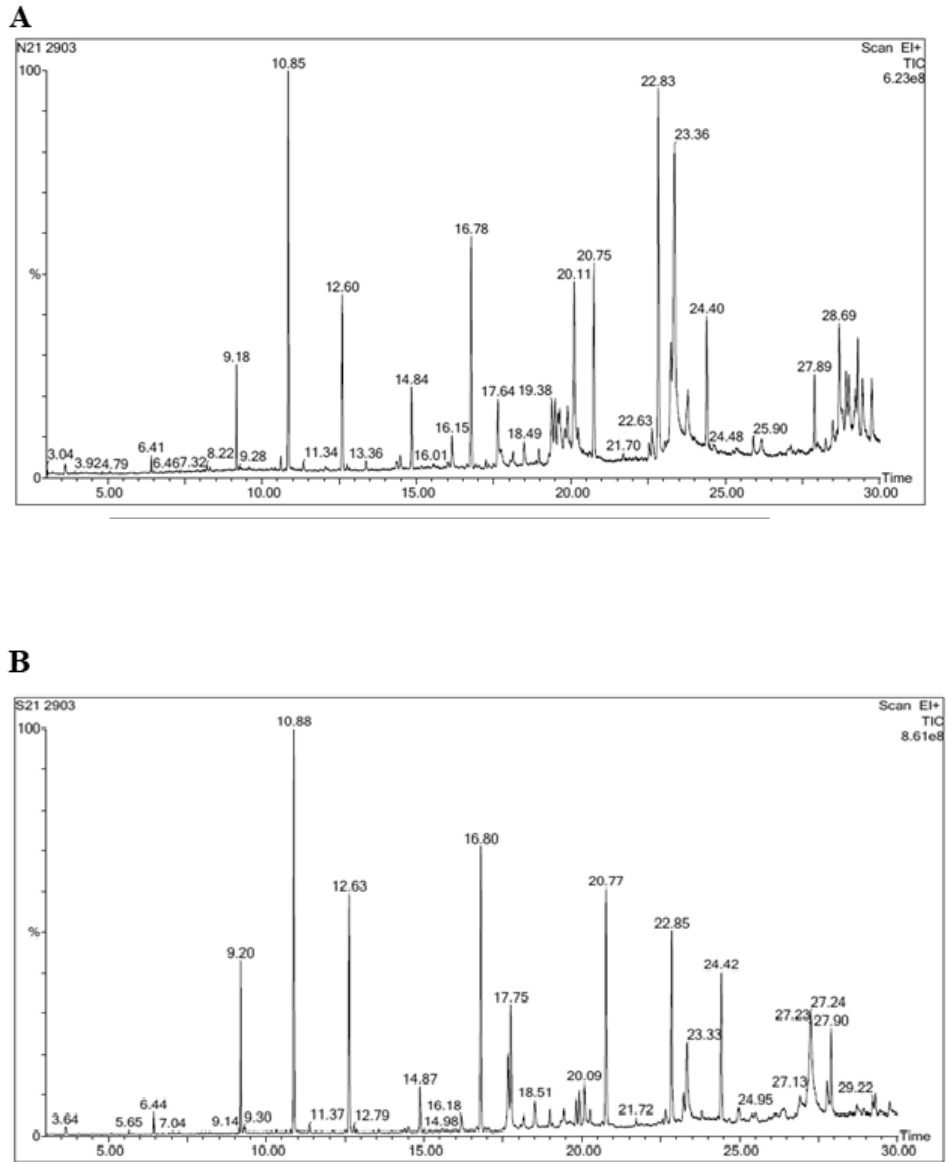


Рис. 2. Профиль жирных кислот штамма *Chlorella* sp. KACC 21, выращенного в условиях достаточного (A) и лимитированного (B) количества нитратов и фосфатов в среде

Таблица 3. Сравнение профилей жирных кислот штамма *Chlorella sp.* КАСС 21, выращенного в условиях достаточного и лимитированного количества нитратов и фосфатов в среде по времени удерживания (ВУП) и площади пиков (ПП)

Соединение	Нормальные условия		Стрессовые условия	
	ВУП	ПП, %	ВУП	ПП, %
Гептадекан	14,838	1,494	14,873	1,275
6-гидрокси-4,4,7а-триметил-5,6,7,7а-тетрагидробензофуран-2(4Н)-он	16,154	0,702	16,179	0,646
9-гексадеценовая кислота	19,645	1,976	19,625	0,523
Метилловый эфир гексадекановой кислоты	19,440	6,332	19,430	1,019
Бутил-4-гептиловый эфир фталевой кислоты	19,890	2,085	19,915	0,912
Пентадекановая кислота	20,110	5,274	20,09	1,482
Бутил-3-гексилловый эфир фталевой кислоты	20,235	1,041	20,260	0,403
Метилловый эфир 9,12,15-октадекатриеновой кислоты	22,631	0,660	22,656	0,594
Фитол	22,831	7,593	22,851	0,594
Линоэлаидиновая кислота	23,246	2,854	23,226	1,032
Метилловый эфир 8,11,14-гептадекатриеновой кислоты	23,361	10,603	23,342	4,314
Эйкозановая кислота	23,792	1,655	23,802	0,316
2-диметиламиноэтиловый эфир октановой кислоты	25,912	0,455	25,402	0,421
Этиловый эфир (все-Z)-5,8,11,14-эйкозатетраеновой кислоты (стандарт)	25,387	0,745	25,502	0,557
Этиловый эфир (Z, Z, Z)-9,12,15-октадекатриеновой кислоты (стандарт)	27,258	0,683	27,513	0,275
Олеиновая кислота	26,178	0,638	28,358	0,4
Триметилсилиловый эфир <i>цис</i> -4,7,10,13,16,19-докозагексаеновой кислоты	28,488	2,828	28,538	0,483
Метилловый эфир докозагексаеновой кислоты	28,689	0,544	29,219	0,538
Триметилсилиловый эфир (Z)-5,8,11-эйкозатриеновой кислоты	28,779	1,046	28,538	0,483
<i>цис</i> -5,8,11,14,17-эйкозапентаеновая кислота	29,004	1,074	9,196	2,521
Циклотетрадекан	9,176	5,955	10,877	8,701
2,4-ди-трет-бутилфенол	10,847	5,955	10,877	8,701

1-гексадеканол	12,597	3,057	12,632	5,952
1-нонадецен	16,779	4,100	16,804	7,437
Неофитадиен	17,639	1,629	17,664	2,859
6,10,14-триметил-пентадекан-2-он	17,734	0,782	17,749	3,859
1-докозен	20,750	3,813	20,770	6,638
1-генейконазол	27,888	1,431	27,898	1,999

Заключение

Лимитирование питательных веществ (азот и фосфор) в среде культивирования влияет на выработку биохимических соединений клетками штаммов пресноводных микроводорослей, при этом исследованные штаммы по-разному реагируют на стрессовые условия. Так, в клетках *Chlorella* sp. КАСС 21 в условиях стресса общее содержание белка и липидов было в несколько раз выше, чем при нормальных условиях культивирования. У *Grasiella* sp. КАСС 19 отмечено более высокое содержание биомолекул в клетках, выращенных в нормальных условиях. В биомассе *Chlorella* sp. КАСС 21 выявлено наличие насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот и их накопление в стрессовом состоянии, что позволяет рассматривать эту микроводоросль в качестве потенциального сырья для производства биотоплива.

Авторы выражают благодарность Научно-исследовательскому совету Департамента науки и техники при правительстве Индии за финансовую поддержку (грант SO: No / SB / FT / LS-389/2012 и BESI W2E, США), а также сотрудникам Карунского научно-технологического института за помощь в исследованиях.

REFERENCES

- Bélangier-Lépine, F., Tremblay A., Huot Y., Barnabé S. 2018. Cultivation of an algae-bacteria consortium in wastewater from and industrial park: effect of environmental stress and nutrient deficiency on lipid production. *Biores. Technol.* 267: 657–665.
- Bligh E.G., Dyer W.M. 1959. A rapid method of lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911–917.
- Cai T., Park S.Y., Li Y. 2013. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 19: 360–369.
- Chen M., Tang H., Ma H., Holland T.C., Ng K.Y., Salley S.O. 2011. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Biores. Technol.* 102: 1649–1655.
- Cheng D., He Q. 2014. Assessment of environmental stresses for enhanced microalgal biofuel production – an overview. *Front Energy Res.* 2: 26.

- Courchesne N.M.D., Parisien A., Wang B., Lan C.Q. 2009. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *J. Biotechnol.* 141: 31–41.
- Dean A.P., Sigeo D.C., Estrada B., Pittman J.K. 2010. Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. *Biores. Technol.* 101: 4499–4507.
- Deng X., Fei X., Li Y. 2011. The effects of nutritional restriction on neutral lipid accumulation in *Chlamydomonas* and *Chlorella*. *Afr. J. Microbiol. Res.* 5: 260–270.
- Fan J., Cui Y., Wan M., Wang W., Li Y. 2014. Lipid accumulation and biosynthesis genes response of the oleaginous *Chlorella pyrenoidosa* under three nutrition stressors. *Biotechnol. Biofuels.* 7(1): 1–14.
- Giordano M., Kansiz M., Heraud P., Beardall J., Wood B., McNaughton D. 2001. Fourier transform infrared spectroscopy as a novel tool to investigate changes in intracellular macromolecular pools in the marine microalga *Chaetoceros muellerii* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 37: 271–279.
- Gonçalves A.L., Pires J.C.M., Simões M. 2017. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Res.* 24: 403–415.
- Griffiths M.J., Harrison S.T.L. 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J. Appl. Phycol.* 21: 493–507.
- Lacour T., Sciandra A., Talec A., Mayzaud A., Bernard O. 2012. Neutral lipid and carbohydrate productivities as a response to nitrogen status in *Isochrysis* sp. (T-ISO; Haptophyceae): Starvation versus Limitation. *J. Phycol.* 48: 647–656.
- Li Y.Q., Horsman M., Wang B., Wu N., Lan C.Q. 2008. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochlorisoleoabundans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81: 629–636.
- Ma Y., Wang Z., Yu C., Yin Y., Zhou G. 2014. Evaluation of the potential of 9 *Nannochloropsis* strains for biodiesel production. *Biores. Technol.* 167: 503–509.
- McGinn P.J., Dickinson K.E., Bhatti S., Frigon J.-C., Guiot S.R., O’Leary S.J.B. 2011. Integration of microalgae cultivation with industrial waste remediation for biofuel and bioenergy production: opportunities and limitations. *Photosynth. Res.* 109: 231–247.
- Minhas A.K., Hodgson P., Barrow C.J., Adholeya A. 2016. A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. *Front Microbiol.* 7: 546.
- Ördög V., Stirk W.A., Bálint P., van Staden J., Lovász C. 2012. Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. *J. Appl. Phycol.* 24: 907–914.
- Pancha I., Chokshi K., George B., Ghosh T., Paliwal C., Maurya R., Mishra S. 2014. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Biores. Technol.* 156: 146–154.
- Pauline MAJ., Achary A. 2018. Cultivation of *Chlorococcumoleofaciens* in domestic waste water and comparison of growth in phototrophic and heterotrophic mode. *Phykos.* 48(1): 78–84.
- Procházková G., Brányiková I., Zachleder V., Brányik T. 2014. Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. *J. Appl. Phycol.* 26(3): 1359–1377.
- Rawat I., Kumar R.R., Mutanda T., Bux F. 2011. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Appl. Energy.* 88: 3411–3424.

- Sharma K.K., Schuhmann H., Schenk P.M. 2012. High lipid induction in microalgae for biodiesel production *Energies*. 5: 1532–1553.
- Stehfest K., Toepel J., Wilhelm C. 2005. The application of micro-FTIR spectroscopy to analyze nutrient stress-related changes in biomass composition of phytoplankton algae. *Plant Physiol. Biochem.* 43: 717–726.
- Sureshkumar P., Jibu Thomas., Siva Subramanian J. 2017. Rapid method for simultaneous discrimination of microalgae and determination on biochemical composition based on vibrational spectroscopy. *Int. J. Algae*. 19(4): 385–396. <https://doi.org/10.15407/alg27.04.403>
- Wagner H., Liu Z., Langner U., Stehfest K., Wilhelm C. 2010. The use of FTIR spectroscopy to assess quantitative changes in the biochemical composition of microalgae. *J. Biophotonics*. 3: 557–566.

Подписала в печать Е.К. Золотарева

Jibu Thomas, Daliya Joseph, Pandian Sureshkumar

Algae Biomass Research Laboratory, Department of Biotechnology, Karunya Institute of Technology and Sciences, Coimbatore 641114, Tamil Nadu, India

Stress induced production of high-value organic compounds from freshwater microalgae

Because of high lipid productivity and potential cultivation in non-fertile areas, microalgae has been renowned as a reliable resource for biodiesel production and various high-value bioactive compounds. They can grow rapidly, synthesize, and accumulate large amounts (20–50% of dry weight) of neutral lipids (mainly in the form of triacylglycerol, TAG). The production of lipids, carotenoids, and algal biomass can be enhanced by inducing various environmental stress factors. The present study investigates on effect of nutrient limitation on biomass and lipid production of freshwater microalgae *Grasiella* sp. and *Chlorella* sp. under two different conditions of cultivation viz. normal and nutrient limited conditions. Stress was induced in the form of nitrogen and phosphorous deficiency in the cultivation media. Results found that biomass obtained from nutrient-limited conditions was comparatively higher than normal. The dry weight of biomass for *Chlorella* sp. under normal and nutrient-limited conditions was found to be 0.78 g/L and 0.96 g/L, respectively, and *Grasiella* sp. 0.48 g/L and 0.8 g/L respectively. FT-IR analysis revealed nutrient limitation influence the change in the biochemical composition in the biomass and varied between the species. Total lipid content for *Grasiellasp.* KACC 19 under normal and nutrient limited conditions were found to be 0.0131 g/L and 0.0765 g/L, and *Chlorella* sp. KACC 21 was found to be 0.1125 g/L and 0.2178 g/L respectively. The fatty acid profiling revealed the presence of saturated and MUFA and accumulation of those fatty acids in nutrient-limited condition thereby considered these microalgae as a potential feedstock for the production of biofuel.

Key words: microalgae, nutrient limitation, biodiesel, FTIR, lipids, biomolecules