

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 158 – 164

B. K. Zayadan, A. A. Usserbayeva, F. K. Sarsekeyeva, A. K. Sadvakasova, K. Bolatkhan

Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan.

E-mail: zbolatkhan@gmail.com

**STUDY OF INFLUENCE OF DIFFERENT CONCENTRATIONS
OF NITROGEN IN THE NUTRIENT MEDIUM ON THE PRODUCTIVITY
OF BIOMASS AND LIPIDS IN CYANOBACTERIA STRAIN
OF *CYANOBACTERIUM SP. IPPAS B-1200***

Abstract. The effect of various concentrations of nitrogen (2.5, 1.25 and 0.25 g/l) in the Zarrook nutrient medium on the productivity of biomass, accumulation of lipids by cells of *Cyanobacterium* sp. IPPAS-1200, as well as fatty-acid composition of lipids. It was found that the concentration of 2.5 g/l was optimal for the growth of the strain, while the dry weight of the biomass was 2.7 g per liter of nutrient medium. At the same time, active accumulation of lipids by cells of *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 was observed on a medium containing 0.25 g/l nitrogen and was 195 mg per 1 g dry weight. Analysis of the composition of fatty acid composition of total lipids of cells *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 during cultivation in a medium with standard nitrogen concentration (2.5 g/l) and reduced in 10 times (0.25 g/l) showed that there is no significant change in the LC composition.

It can be concluded that this strain should be cultivated in 2 phases: 1) with normal nitrogen concentration for the most biomass yield and 2) with 10% nitrogen concentration for the maximum index of lipid accumulation in biomass.

Key words: *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200, optimization of cultivation conditions, biomass, fatty acids, biodiesel.

УДК 602.3: 579.8; 606:622.75

Б. К. Заядан, А. А. Усербаева, Ф. К. Сарсекеева, А. К. Садвакасова, К. Болатхан

Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ АЗОТА
В ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ НА РОСТ И НАКОПЛЕНИЕ ЛИПИДОВ
В КЛЕТКАХ ШТАММА *CYANOBACTERIUMSP. IPPAS B-1200***

Аннотация. В работе было изучено влияние различных концентраций азота (2,5; 1,25 и 0,25 г/л) в питательной среде Заррука на продуктивность биомассы, накопление липидов клетками штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS-1200, а также жирно-кислотный состав липидов. Установлено, что оптимальной для роста штамма явилась концентрация 2,5 г/л, при этом сухой вес биомассы составил 2,7 г на литр питательной среды. В то же время активное накопление липидов клетками *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 наблюдалось на среде содержащей 0,25 г/л азота и составило 195 мг на 1 г сухого веса. Установлено, что существенного изменения жирно-кислотного состава суммарных липидов клеток *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 при культивировании их на среде со стандартной концентрацией азота (2,5 г/л) и пониженнной в 10 раз (0,25 г/л) не отмечается.

Полученные данные свидетельствуют о том, что для повышения выхода липидов данный штамм нужно культивировать в двухфазном режиме: 1) с нормальной концентрацией азота в среде для достижения максимальных показателей по приросту биомассы и 2) с 10-кратным дефицитом азота для достижения максимальных показателей по накоплению липидов в биомассе.

Ключевые слова: *Cyanobacterium* sp. IPPASB-1200, оптимизация условий культивирования, жирные кислоты, биодизель.

Введение. Технология использования цианобактерий в качестве топливного сырья занимают одно из центральных мест среди подходов современной альтернативной энергетики. Создание новой технологии получения биодизеля из биомассы цианобактерий, активно продуцирующих жирные кислоты, в настоящее время актуально, перспективно и представляет большой интерес для развития альтернативной энергетики в мире [1]. Жирные кислоты (ЖК) цианобактерий могут быть потенциальными предшественниками для возобновимого производства цианодизеля и других полезных продуктов. При этом для того, чтобы использовать жирные кислоты цианобактерий в качестве сырья для получения биодизеля необходимо позаботиться как об увеличении их количества так и об их качестве [2-4]. На сегодняшний день оптимизация условий культивирования различных микроорганизмов является актуальной проблемой в современной биотехнологии. Элементы минерального питания, как и другие факторы внешней среды играют в клетках цианобактерий субстратную и регуляторную роль. Субстратная роль элементов заключается в том, что они входят в состав органических веществ, являющихся, в свою очередь, строительным материалом клеток и их органелл. Как составная часть мембран, ферментов, электронно-транспортных цепей дыхания и фотосинтеза, аппарата синтеза белка, элементы минерального питания регулируют скорость основных функций клетки [5, 6]. Одним из минеральных элементов, необходимых фотосинтезирующему организму в наибольших количествах является азот. Он входит в состав всех аминокислот, следовательно, белков, составляющих важнейшую часть протопласта и являющимися компонентами всех клеточных мембран. Азот входит в состав нуклеиновых кислот, хлорофилла, полиаминов, которые регулируют процессы деления клеток. При недостатке азота, изменяются темпы развития клетки, накапливаются углеводы, которые не могут быть использованы для синтеза аминокислот и других азотных соединений. Кроме этого, вследствие нарушения синтеза хлорофилла, снижается интенсивность фотосинтеза, что сказывается на росте культуры и окраске клеток [7-9].

В связи с этим, целью данной работы было изучение влияния различных концентраций азота в питательной среде на рост и накопление липидов в клетках штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200.

Материалы и методы исследования. В качестве материала для исследований использовали штамм цианобактерии *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200, выделенный из пробы воды озера Балхаш. Штамм *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 задокументирован в Коллекции микроводорослей Института физиологии растений Российской Академии Наук и в «Республиканской коллекции микроорганизмов» Комитета науки Министерства образования и науки РК [10].

Для культивирования цианобактерии использовали среду Заррука [11], выращивание проводили в условиях лабораторного люминостата в непрерывном режиме при температуре 26-30°C, и искусственном освещении. Об интенсивности культуры судили по изменению оптической плотности на спектрофотометре PD - 303UV (Япония). Концентрирование биомассы проводили центрифугированием. Пасту цианобактерий высушивали до воздушно-сухого состояния в сушильном шкафу при 45°C. Для выделения липидов, брали навеску массой 15-20 мг экстрагировали смесью хлороформ: метanol в соотношении 2:1 (реактив Фолча). Далее определение суммарных липидов проводили калориметрически по методу, предложенному Агатовой Л. И. [12]. Для определения ЖК состава, клетки фиксировали горячим (60°C) изопрапонолом и 0,02 % ионолом и инкубировали в водяной бане при 65°C 10 минут. После чего с добавлением к суспензии метанола и ацетилхлорида (9:1) и выдержки 60 минут при 70°C получали метиловые эфиры жирных кислот. Которые разделяли на ГЖХ-МС Aligent 7890 GC с 60 м капилярной колонкой DB-23 [13].

Результаты и их обсуждение. Согласно предыдущим исследованиям, анализ жирнокислотного состава суммарных клеточных липидов, свидетельствует о том, что штамм *Cyanobacterium* sp. имеет высокое содержание миристиновой (14:0) и миристоолеиновой кислот (Δ9-14:1) (30% и 10% от суммы жирных кислот соответственно) [14, 15]. Подобный жирнокислотный состав является редкостью для цианобактерий. Для изучения влияния различных концентраций азота в питательной среде на рост опытной культуры цианобактерии использовали три различные концентрации азота в питательной среде Заррука: контроль со стандартной концентрацией азота – 2,5 г/л.; в 2 раза меньше нормальной концентрации азота – 1,25 г/л.; в 10 раз меньше стандартной концентрации азота – 0,25 г/л. В качестве источника азота использовали NaNO_3 .

Культивирование штамма производили в течение 10-ти суток с начальной плотностью клеток 0,03 ед. ОП. Прирост биомассы опытного штамма в среде Заррука с различной концентрацией азота, выраженный через изменения оптической плотности суспензии, показан на рисунке 1.

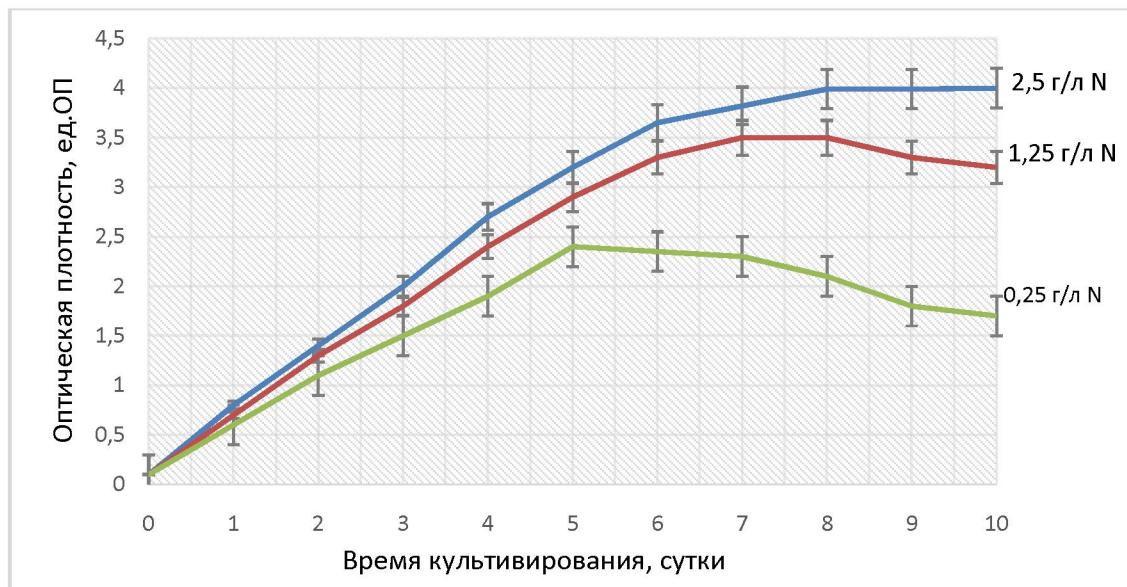


Рисунок 1 – Кривые роста штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 при культивировании в среде с различным содержанием азота

Показано, что при культивировании в среде, содержащей азот в нормальной концентрации (2,5 г/л) скорость роста штамма значительно выше по сравнению с двумя остальными условиями культивирования. В условиях питательной среды содержащей азот в концентрации в 10 раз меньше стандартной, рост начинает замедляться уже на пятые сутки культивирования, при этом максимальная оптическая плотность составило 2,4 ед.ОП. В то время как при культивировании в среде со стандартной концентрацией азота и пониженный в 2 раза данный показатель составил 3,99 и 3,5 ед. ОП соответственно.

Для определения сухого веса, суммарного количества и жирнокислотного состава липидов, по истечению 10-ти суток культивирования в заданных трех условиях плотную суспензию исследуемого штамма центрифугировали. В результате опыта, при культивировании в среде стандартного состава выход сухой биомассы составлял – 2,7 г/л; в среде содержащей азот в 2 раза меньше стандартной концентрации – 2,1 г/л; уменьшение концентрации азота в 10 раз соответственно и сказалась на скорость роста, этот показатель составил 1,3 г/л (рисунок 2).

Полученные результаты анализа биомассы штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS-1200 на содержание липидов, выросшего на стандартной питательной среде с нормальной концентрацией азота, показали, что накопление липидов в данном случае составляют 151 мг на 1 г сухого веса, при культивировании на среде содержащей азот в 2 раза меньше нормальной концентрации этот показатель составил 155 мг на 1 г сухого веса, тогда как снижение концентрации азота в 10 раз от исходной значительно увеличило накопление липидов до 195 мг на 1 г сухого веса (рисунок 3).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что наибольшую продуктивность по накоплению биомассы штамм достигает при условии культивирования на питательной среде Заррука, содержащей азот в стандартной концентрации – 2,5 г/л. Установлено, что уменьшение концентрации азота в среде культивирования в 2 раза влияет на накопление биомассы и липидов весьма незначительно. Вероятно, это связано с тем, что в этих условиях клетки не испытывают азотного голода, который возникает в процессе роста клеток цианобактерий после полного исчерпания азота из среды.

Выявлено, что снижение концентрации азота в среде культивирования в 10 раз вызывает активное накопление липидов клетками *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200.

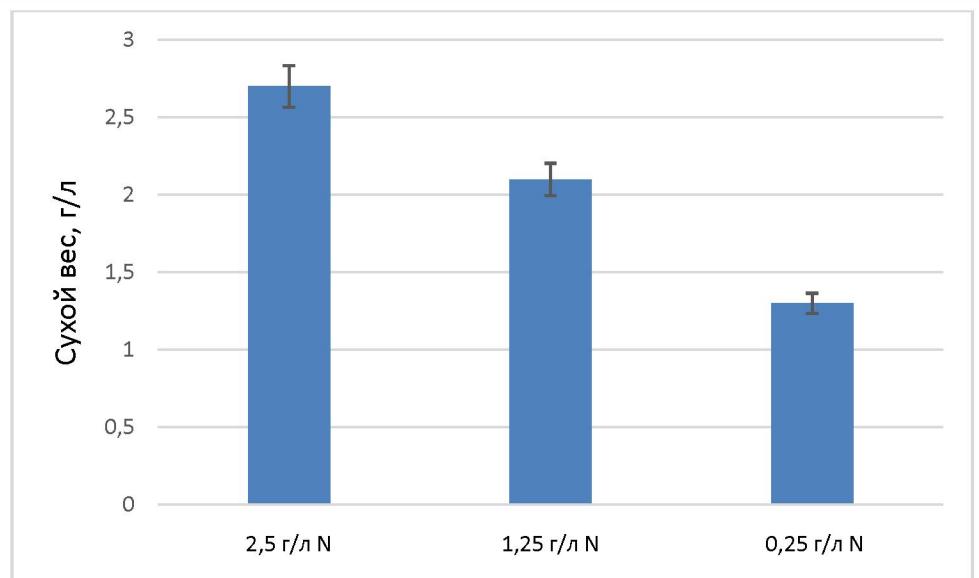


Рисунок 2 – Выход сухого веса клеток штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 при культивировании на средах с различными концентрациями азота

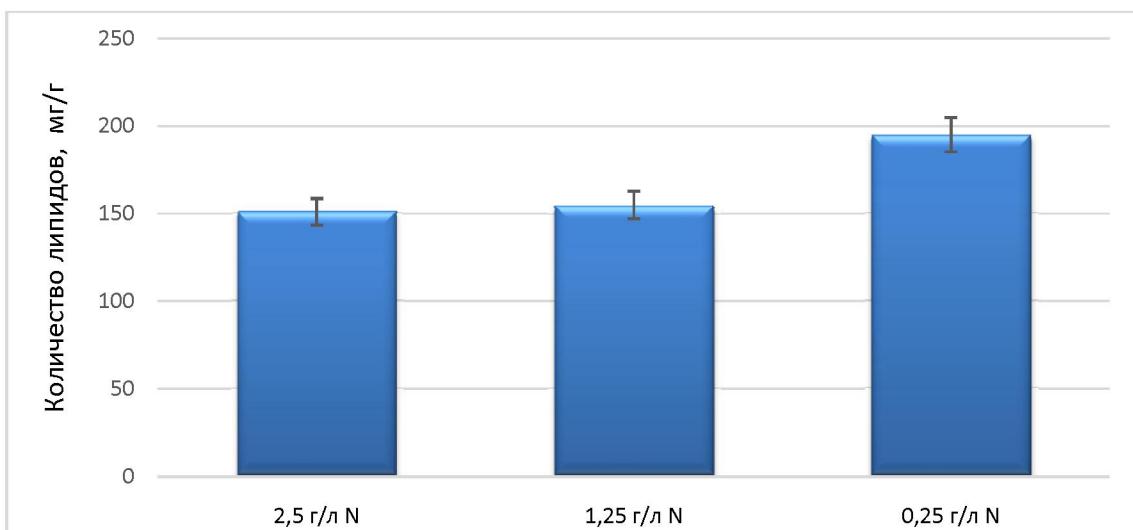


Рисунок 3 – Суммарное содержание липидов в клетке штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 при культивировании на средах с различными концентрациями азота

В связи с этим, нами проанализирован жирнокислотный состав липидов в клетках штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 при культивировании их на среде со стандартной концентрацией азота и пониженной концентрацией в 10 раз. Полученные хроматограммы представлены на рисунках 4 и 5. Результаты приведены в таблице.

Как видно из таблицы 1, в клетках штаммах, при культивировании на среде с пониженной концентрацией азота в 10 раз, % существенного изменения ЖК состава не отмечается. При этом наблюдалось лишь незначительное повышение индекса ненасыщенности, что вполне объяснимо при стрессе. По литературным данным подобные результаты наблюдались ранее и при холодовом стрессе [16, 17]. Исходя из результатов опыта, установлено, что понижение концентрации азота в среде культивирования в 10 раз не оказалось существенного влияния на качественный состав ЖК и привело лишь к незначительному повышению количества ненасыщенных ЖК.

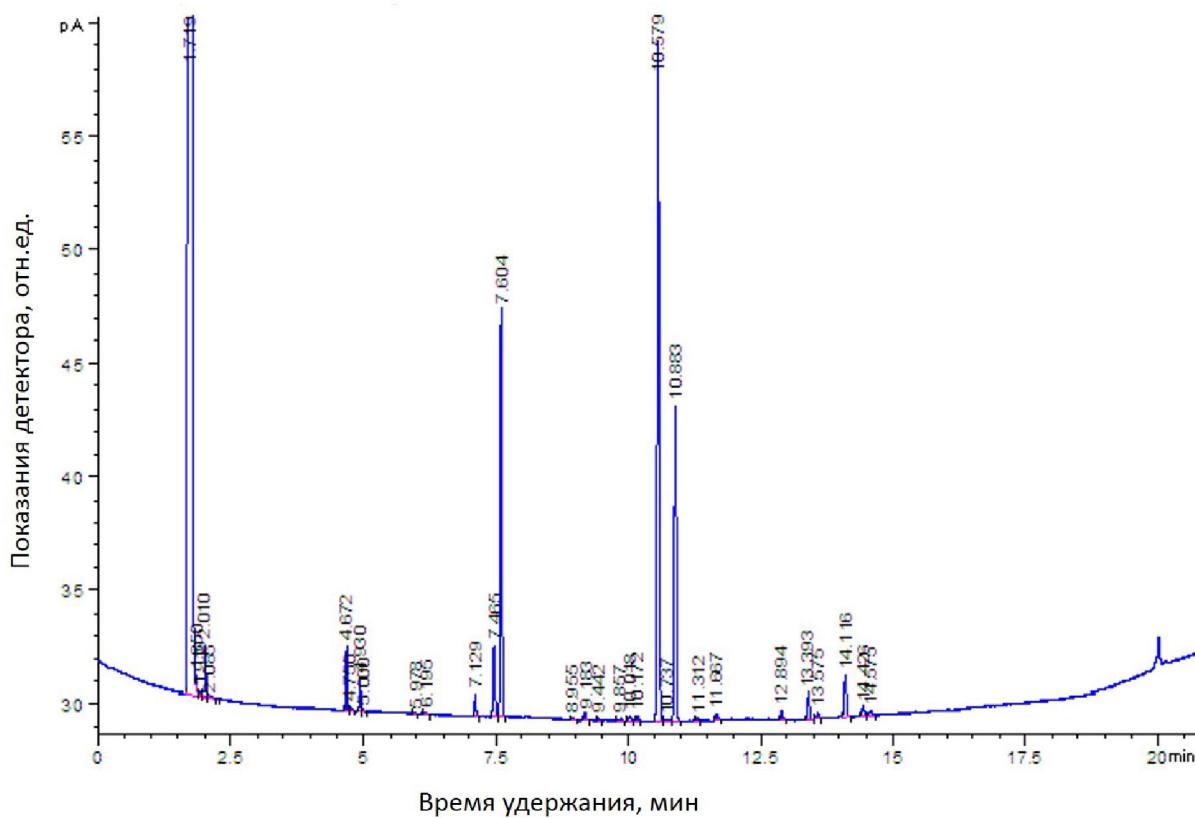


Рисунок 4 – Хроматограмма жирных кислот липидов клеток *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 при культивировании в среде со стандартной концентрацией азота

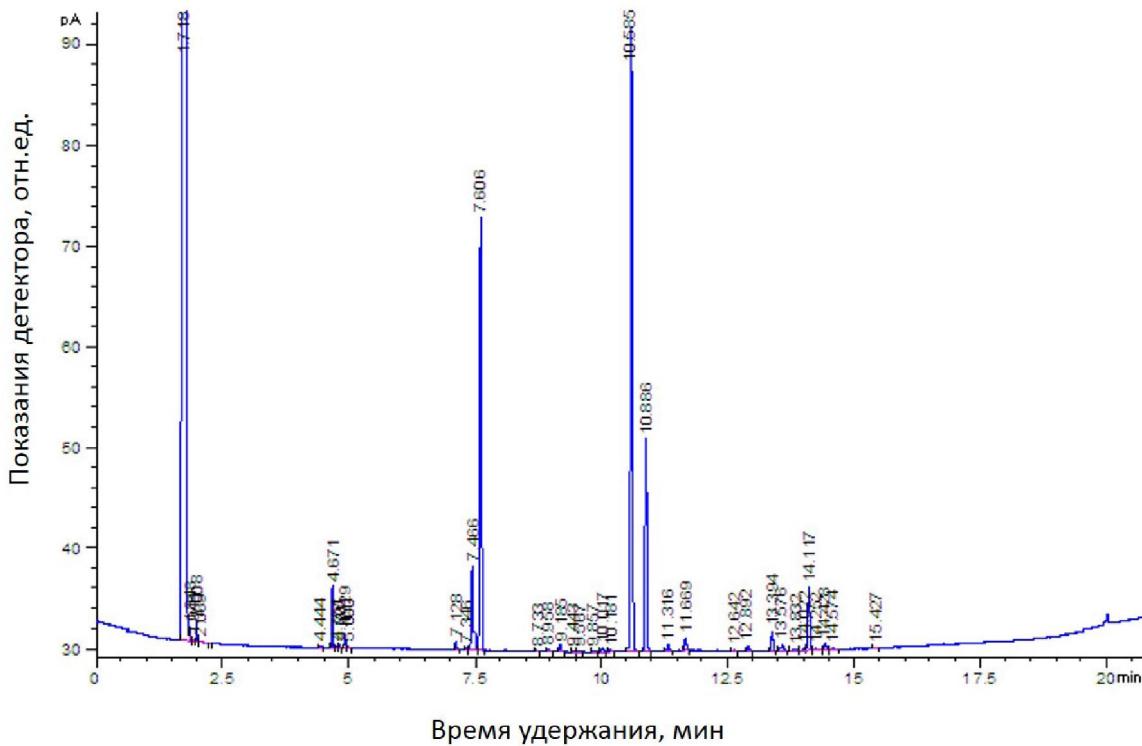


Рисунок 5 – Хроматограмма жирных кислот липидов клеток *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 при культивировании в среде с пониженной концентрацией азота в 10 раз

Жирнокислотный состав липидов в клетках штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200

Жирные кислоты	Содержание ЖК, при культивировании на среде со стандартной концентрацией азота, %	Содержание ЖК, при культивировании на среде с пониженной концентрацией азота в 10 раз, %
12:0	2,0	0,2
14:0	29,4	27,7
14:1Δ9	7,27	9,6
15:0	0,2	0,2
16:0	20,3	15,7
16:1Δ7	0,1	0,1
16:1Δ9	39,0	43,8
17:1Δ10	0,1	0,1
18:0	1,2	0,6
18:1Δ11	0,4	2,0
UI, rel. units	0,490	0,509

Таким образом снижение концентрации азота в среде культивирования в 10 раз вызывает активное накопление липидов клетками *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200. Что подтверждает многие литературные данные, что дефицит азота является стрессом для клеток цианобактерий, при котором усиливается биосинтез липидов как один из адаптационных механизмов [18-20].

Полученные данные свидетельствуют о том, что для повышения выхода липидов данный штамм нужно культивировать в двухфазном режиме: 1) с нормальной концентрацией азота в среде для достижения максимальных показателей по приросту биомассы и 2) с 10-кратным дефицитом азота для достижения максимальных показателей по накоплению липидов в биомассе.

REFERENCES

- [1] Singh J., Gu S. (2010) Commercialization potential of microalgae for biofuels production, Renew. Sust. Energ. 14: 2596–2610. DOI: 10.1016/j.rser.2010.06.014
- [2] Los DA. (2014) Desaturases of fatty acids. ISBN: 978-5-91522-391-1.
- [3] Anne M. Ruffing, Howland D.T., (2012) Physiological Effects of Free Fatty Acid Production in Genetically Engineered *Synechococcus elongatus*PCC 7942, Biotechnol Bioeng. 109(9): 2190–2199. DOI: 10.1002/bit.24509
- [4] Nozzi NE, Oliver JWK, Atsumi S. (2013) Cyanobacteria as a platform for biofuel production, Front Bioeng Biotechnol, 1:7, DOI:10.3389/fbioe.2013.00007
- [5] Al-Thani R.F, Potts M., (2012) Cyanobacteria, oil—and cyanofuel? in Ecology of cyanobacteria II: their diversity in space and time, ed. Brian A. Whitton 427–440.
- [6] Quintana N, Van der Kooy F, Van de Rhee M.D, Voshol G.P, Verpoorte R. (2011) Renewable energy from Cyanobacteria: energy production optimization by metabolic pathway engineering Appl.Microbiol.Biotechnol., 91:471–490.
- [7] B.K. Zayadan, U.M. Dyo, A.A. Usserbayeva, N. Amageldy, Bolatkhan K., F.K. Sarsekeyeva, S. Purton (2013) Study of cell growth and accumulation of lipids in cells of newly isolated microalgae scales under cultivation under different conditions [Izuchenie rosta kletok I nakopleniya lipidov v kletkah vnov vydelenyh shtamov mikrovodorosley pri kultivirovaniyu v raslichnyh usloviyah] 1(57):34-39. (In Russian)
- [8] Kiaei, E, etc. (2015) Screening of Cyanobacterial Strains as a Smart Choice for Biodiesel, J. Appl. Environ. Biol. Sci., 5(8): 236-245.
- [9] Erdrich P, Knoop H, Steuer R, Klamt S, (2014) Cyanobacterial biofuels: new insights and strain design strategies revealed by computational modeling. MicrobCellFact 13:128.
- [10] Sarsekeyeva FK, ZayadanB K., Los D.A., Sadvakasova A.K., Usserbaeva A.A., Bolathan K. Strain Cyanobacterium sp.IPPAS-1200 as a raw material for the production of biofuel [Shtam *Cyanobacterium* sp. IPPAS-1200 v kachestve syrya dlya polucheniya biotopliva], Patent of the Republic of Kazakhstan №1750 от 30.09.2016. (In Russian)
- [11] Sirenko LA, Sakevich AI, etc. (1975)Methods of physiological and biochemical study of algae in hydrobiological practice [Metody fiziologo-biohimicheskogo issledovaniya vodorosley v hidrobiologicheskoy praktike], Nauchniy mir, Kiev, 248.(In Russian)
- [12] Folch et al., (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, J BiolChem., 226: 497.
- [13] Jayasree N.B, Aneesh.T.P, Visakh Prabhakar. (2012) GC-MS, HPLC and AAS analysis of Fatty acids, Amino acids and Minerals in Red algae *Ampherea anceps*, International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Suppl 1. 4: 459-468.
- [14] Sarsekeyeva F.,A.Usserbaeva, B.K. Zayadan, Mironov K., Sidorov R., Kozlova A., Kupriyanova E., M. Sinetova, D.A.Los, (2014) Isolation and characterization of a new cyanobacterial strain with a unique fatty acid composition, Advances In Microbiology 4(15): 1033-1043.

- [15] Usserbaeva A., Zayadan B., Sinetova M., Kozlova A., Mironov K., Kupriyanova E., Sidorov R., Los D. (2015) Characterization of cyanobacterial strain IPPAS B-1200 with a unique fatty acid composition, Abstract book ECCO XXXIV European Culture Collections as tools in research and biotechnology Paris, 74-75.
- [16] Inaba M., Suzuki I., Szalontai B., Kanesaki Y., Los D.A., Hayashi H., Murata N. (2003) Genetically-engineered rigidification of membrane lipids enhances the cold inducibility of gene expression in *Synechocystis*, Biol. Chem., 278(14):12191-12198.
- [17] Maali-Amiri R., Yur'eva N.O., Shimshilashvili K.R., Goldenkova-Pavlova I.V., Pchelkin V.P., Kuznetsova E.V., Tsydendambaev V.D., Trunova T.I., Los D.A., Salehi Jouzani G.R., Nosov A.M. (2010) Expression of acyl-lipid Δ12-desaturase gene in prokaryotic and eukaryotic cells and its effect on cold stress tolerance, Integr. Plant Biol., 52(3):289-297.
- [18] I. C. de Loura, J. P. Dubacq, J. C. Thomas (1987) The Effects of Nitrogen Deficiency on Pigments and Lipids of Cyanobacteria, Plant Physiol., 83(4): 838-843.
- [19] Kumar S.S., Uma L., Subramanian G. (2003) Nitrogen stress induced changes in the marine cyanobacterium Oscillatoria willei BDU 130511. FEMS Microbiol Ecol., 45(3):263-72. doi: 10.1016/S0168-6496(03)00162-4.
- [20] Kumar R., Biswas K., Singh PK, Singh PK, Elumalai S., Shukla P., Pabbi S. (2017) Lipid production and molecular dynamics simulation for regulation of accD gene in cyanobacteria under different N and P regimes. Biotechnol Biofuels. 17;10:94. doi: 10.1186/s13068-017-0776-2.

Б. К. Заядан, А. А. Усербаева, Ф. К. Сарсекеева, А. К. Садвакасова, К. Болатхан

Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан

**CYANOBACTERIUM SP. IPPAS B-1200 ШТАМЫНЫҢ КЛЕТКАЛАРЫНДА
ЛИПИДТІҢ ЖИНАҚТАЛУЫНА ҚОРЕКТІК ОРТАДАҒЫ
ӘР ТҮРЛІ АЗОТ КОНЦЕНТРАЦИЯСЫНЫҢ ӘСЕРІН ЗЕРТТЕУ**

Аннотация. Жұмыста *Cyanobacterium* sp. IPPAS-1200 штамының клеткаларында липидтің жинақталуына, биомассаның өнімділігіне, сонымен қатар липидтердің май-қышқылды құрамына Заррука коректік ортасындағы азоттың әр түрлі концентрациясының (2,5; 1,25 и 0,25 г/л) әсері зерттелді. Штамның өсуіне оптимальды концентрация 2,5 г/л екені аныкталды, сонымен бірге биомассаның күрғақ салмағы литр коректік ортаға шакқанда 2,7 г құрады. Сонымен бірге *Cyanobacterium* sp. IPPAS-1200 штамының клеткаларында липидтің жинақталуы 0,25 г/л, азоты бар қоректік ортада белсенді болды, және 1 г күрғақ салмағы 195 мг құрады. *Cyanobacterium* sp. IPPAS-1200 клеткасының жинақтық липидтерінің май-қышқылдық құрамы азот концентрациясы стандартты ортада (2,5 г/л) және 10 есе төмен (0,25 г/л) оргаларда дақылдау барысында май-қышқылдық құрамының айтарлықтай өзгермейтіні аныкталды.

Алғынған нәтижелерге байланысты липидтердің жинақталуы жоғары болуы үшін, атамыш штамды екі фазалы режимде дақылдау кажет: 1) биомассаның өсуі бойынша максималды көрсеткіштерге жету үшін қоректік ортадағы қалыпты азот концентрациясы, және 2) биомассада липидтердің жинақталуы бойынша максималды көрсеткіш алу үшін 10 есе азот тапшылығында дақылдау.

Түйин сөздер: *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200, дақылдау жағдайының оптимизациясы, май қышқылдары, биодизель.