

Усербаева А.¹, Заядан Б.², Садвакасова А.³, Сарсекеева Ф.⁴, Талпакова А.⁵

¹студентка PhD-докторантуры, e-mail: aizhan.userbaeva@gmail.com

²доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент НАН РК, email: zbolatkhan@gmail.com

³кандидат биологических наук, и.о. доцента, e-mail: asem182010@gmail.com

⁴PhD, e-mail: sarsekeyeva83@mail.ru

⁵магистрант, e-mail: anara.talpakova@mail.ru

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

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ЭКСТРАКЦИИ ЛИПИДОВ ИЗ БИОМАССЫ ШТАММА *CYANOBACTERIUM SP. IPPAS B-1200* - ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ПРОДУЦЕНТА БИОДИЗЕЛЯ

Цианобактерии являются современными и перспективными продуцентами биодизельного топлива. Несмотря на то, что существует большой объем знаний об высоком накоплении липидов отдельными штаммами цианобактерий на лабораторном уровне, открытым остается вопрос о экстракции липидов, позволяющих извлечь максимальное количество внутриклеточных липидов из биомассы. *Cyanobacterium sp. IPPAS B-1200* – штамм цианобактерии, изолированный из озера Балхаш. Согласно предыдущим исследованиям, анализ жирнокислотного состава суммарных клеточных липидов показал, что штамм *Cyanobacterium sp.* имеет высокое содержание миристиновой (14:0) и миристоолеиновой кислот (Δ9-14:1) (30% и 10% от суммы жирных кислот, соответственно). Подобный ЖК-состав является редкостью для цианобактерий и, одновременно, именно 14:0 и Δ9-14:1 ЖК являются потенциальными целевыми продуктами для производства биотоплива. В статье рассмотрен процесс экстракции липидов из цианобактерий с использованием различных органических растворителей. Проведен сравнительный анализ методов экстракции липидов из биомассы штамма цианобактерии *Cyanobacterium sp. IPPAS B-1200*. Указаны экспериментальные данные выхода липидной фракции при экстракции с использованием различных органических растворителей. В качестве экстрагентов использовали следующие составы: хлороформ-метанол 2:1; хлороформ-метанол 1:2; гексан-изопропанол 3:2. Установлено, что экстракция липидов смесью метанол-хлороформ 2:1 (метод Блайя и Дайера) дает наибольший выход липидов и составляет 9% от сухого вещества биомассы исследуемого штамма. Полученные данные позволяют считать данный метод оптимальным.

Ключевые слова: липиды, экстракция, *Cyanobacterium sp.*, биодизель.

Userbaeva A.¹, Zajadan B.², Sadvakasova A.³, Sarsekeeva F.⁴, Talpakova A.⁵

¹PhD-student, e-mail: aizhan.userbaeva@gmail.com

²Doctor of Biological Sciences, Professor, Corresponding Member of NAS RK, e-mail: zbolatkhan@gmail.com

³Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, e-mail: asem182010@gmail.com

⁴PhD, e-mail: sarsekeyeva83@mail.ru

⁵master student, e-mail: anara.talpakova@mail.ru

Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

Comparative analysis of lipid extraction methods for biomass of the *Cyanobacterium sp. IPPAS B-1200* strain – potential producer of biodiesel

Cyanobacteria are modern and promising producers of biodiesel. Despite the fact that there is a large amount of knowledge about the high accumulation of lipids by individual strains of cyanobacteria at the laboratory level, the issue of lipid extraction, allowing to extract the maximum amount of intracellular lipids from biomass, remains open. *Cyanobacterium sp. IPPAS B-1200* is a strain of cyanobacteria isolated from Balkhash lake. According to previous studies, the analysis of the fatty acid composition

of total cellular lipids showed that the strain *Cyanobacterium* sp. has a high content of myristic (14: 0) and myristoleic acids (Δ 9-14: 1) (30% and 10% of the sum of fatty acids, respectively). Such an FA composition is a rarity for cyanobacteria, and at the same time, it is 14: 0 and Δ 9-14: 1 that FAs are potential target products for biofuel production. The article considers the process of lipid extraction from cyanobacteria using various organic solvents. A comparative analysis of the methods of lipid extraction from the biomass of the cyanobacterium strain *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200. Experimental data on the yield of the lipid fraction during extraction using various organic solvents are indicated. The following compositions were used as extractants: Chloroform-methanol 2/1; Chloroform-methanol 1/2; Hexane-isopropanol 3/2. It was found that lipid extraction with methanol/chloroform 2/1 (Bligh and Dyer method) gives the highest lipid yield and is 9% of the dry matter of the biomass of the strain under investigation. The obtained data make it possible to consider the Bligh and Dyer method to be optimal. Thus, research directed on study of possibilities of increasing lipid production and providing the good quality raw material will allow to find ways for solution of problem of obtaining the third generation alternative biofuel.

Key words: lipid, extraction, *Cyanobacterium* sp., biodiesel.

Усербаева А.¹, Заядан Б.², Садвакасова А.³, Сарсекеева Ф.⁴, Талпакова А.⁵

¹PhD-докторантураның студенті, e-mail: aizhan.userbaeva@gmail.com

²биология ғылымдарының докторы, профессор, ҚР ҰҒА корреспондент-мүшесі, e-mail: zbolatkhan@gmail.com

³биология ғылымдарының кандидаты, доцент м.а., e-mail: asem182010@gmail.com

⁴PhD, e-mail: sarsekeyeva83@mail.ru

⁵магистрант, e-mail: anara.talpakova@mail.ru

әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

Биодизельдің потенциалды продуценті *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 штамының биомассадан липидтерді экстракциялау әдістерін салыстырмалы талдау

Цианобактериялар биодизель отынының заманауи және перспективті продуценттері болып табылады. Лабораториялық жағдайда цианобактериялардың жеке штамдары липидтерді жоғары дәрежеде жинақтап алатыны туралы көптеген мәліметтердің болуына қарамастан, биомассадан клеткаішілік липидтерді ауқымды көлемде бөліп алуға мүмкіндік беретін липид экстракциясы жайлы сұрақтар әлі де толығымен шешілмей қалып отыр. *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 – Балқаш көлінен бөлініп алынған цианобактерия штаммы. Клеткалық жиынтық липидтерінің май қышқылды құрамының талдауы бойынша *Cyanobacterium* sp. штаммында миристин (14:0) және миристоолеин қышқылдарының (Δ 9-14:1) мөлшері жоғары (сәйкесінше, май қышқылдарының 30% және 10%). Мұндай май қышқылды құрам цианобактерияларда сирек кездеседі, соның ішінде 14:0 және Δ 9-14:1 май қышқылдары биоотын өндіру үшін потенциалды мақсатты өнім болып табылады. Мақалада әр түрлі органикалық ерітінділерді пайдалана отырып, цианобактериялардан липидтер экстракциясын алу процесі қарастырылған. *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 цианобактерия штамының биомассасынан липидтер экстракциясын алу әдісінің салыстырмалы талдауы жүргізілді. Әр түрлі органикалық ерітінділерді қолдана отырып экстракциялау барысында липидтер фракциясы жайлы тәжірибелі мәліметтер көрсетілген. Экстрагент ретінде келесі қосылыстар пайдаланылды: хлороформ-метанол 2/1; хлороформ-метанол 1/2; гексан-изопропанол 3/2. Метанол/хлороформ 2/1 (Блай және Дайер әдісі) қоспаларымен липидтерді экстракциялауда ең көп мөлшерде липидтер шығарылды және зерттелінетін штамм биомассасының құрғақ затының 9% құрайтыны анықталды. Алынған мәліметтер Блай және Дайер әдісінің оңтайлы екенін көрсетеді. Осылайша, белгілі бір шикізат сапасын қамтамасыз ету және липид өнімін арттыру мүмкіндіктерін анықтауға бағытталған зерттеулер үшінші буынды альтернативті биоотын алу мәселелерін шешу жолдарын табуға мүмкіндік береді.

Түйін сөздер: липидтер, экстракциясы, *Cyanobacterium* sp., биодизель.

Введение

Вопрос в отношении получения биодизеля из фототрофов обсуждается более чем 50 лет, но только кризис в середине 1970-х годов послужил причиной финансирования программ по получению энергии из цианобактерий США и Японией (Usui, 1997:487; Naik, 2010:578; Pahl, 2010:298).

Биотопливо «третьего» поколения связывают с использованием биомассы фототрофных микроорганизмов, которая как энергетическое сырье по своим характеристикам превосходит другие сырьевые биоресурсы. Подтверждено, что выращивание цианобактерий является менее затратным, а их высокая продуктивность позволяет получить с единицы площади значительно

больше запасенной химической энергии, нежели при культивировании традиционных наземных сельскохозяйственных культур. Так, например, при культивировании некоторых фототрофных микроорганизмов с гектара можно получать около 98,4 м³ высококачественного биодизеля в год (Da Rós, 2013:2365; Schenk, 2008:20), в то время как, например, из рапса при урожайности 16 ц/га в год можно получить лишь 0,68 м³ этого же биотоплива. Экономические расчеты показывают, что затраты на производство биомассы микроводорослей в объеме 100 т/год составляют около 3000 дол. США в год, и при увеличении масштабов производства затраты снижаются. При культивировании может использоваться диоксид углерода, образующийся при сжигании теплоносителей, что также поможет существенно уменьшить расходы на производство (Chisti, 2007:94; Al-Thani, 2012:427; Pr'ibyl, 2014:241).

Цианобактерии являются современными и перспективными продуцентами биодизельного топлива. Они представляют разнообразную группу граммотрицательных бактерий, способных к кислородному фотосинтезу (Margulis, 1975:21; Griffiths, 2009:493). Жирные кислоты цианобактерий могут быть потенциальными предшественниками для возобновимого производства цианодизеля и других полезных продуктов. Основным преимуществом использования цианобактерий в качестве сырья для получения биомассы является высокая скорость их воспроизводства, способность накапливать значительное количество жиров и, при наличии благоприятных условий, расти в течение всего года. Обычно при оптимальном поступлении питательных веществ и наличии всех факторов роста (солнечный свет, вода, диоксид углерода и минеральные соли) масса данных культур за сутки способна удваиваться. При этом она может служить источником не только триацилглицеридов и углеводов, используемых в производстве биотоплив, но и множества других высокоценных веществ: пигментов, сахаров, витаминов, антибиотиков (Steen, 2010:559; Liu, 2011:6905; Sarsekeyeva, 2015:329).

Жирные кислоты, встречающиеся в цианобактериях, представлены следующими видами: 14:0, 14:1 Δ^9 , 16:0, 16:1 Δ^9 , 16:2 $\Delta^{9,12}$, 18:0, 18:1 Δ^9 , 18:1 Δ^{11} , 18:2 $\Delta^{9,12}$, 18:3 $\Delta^{9,12,15}(\omega^3)^{13}$, 18:3 $\Delta^{6,9,12}$ и 18:4 $\Delta^{6,9,12,15}$. Так в идеале, для получения цианодизеля, цианобактериальный штамм должен содержать большое количество C₁₂-C₁₈ насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот (Krawczyk, 1996:801; Li, 2008:749; Лось,

2014:370). Однако далеко не все виды цианобактерий могут быть использованы в качестве сырья для производства биодизельного топлива. Так как выбор адекватной культуры зависит от количественного содержания липидной фракции и их жирнокислотного состава.

При этом одной из основных задач в производстве биодизельного топлива из цианобактерий является извлечение и получение сложных эфиров – триацилглицеринов (липидов). Несмотря на успехи в культивировании отдельных видов цианобактерий, коммерчески успешных промышленных методов экстракции липидов из их биомассы до сих пор нет. Извлечение липидов из биомассы цианобактерий осложняется наличием плотной, твердой оболочки. Кроме того, на выход продукта – липидной фракции, существенное влияние оказывает подбор экстрагента, так как экстрагирующая способность применяемых органических растворителей разнообразна (Lang, 2001:53; Antoni, 2007:23; Knothe, 2009:729).

В связи с этим следует отметить, что несмотря на то что существует большой объем знаний об высоком накоплении липидов отдельными штаммами цианобактерий на лабораторном уровне, открытым остается вопрос о экстракции липидов, позволяющих извлечь максимальное количество внутриклеточных липидов из биомассы.

Штамм *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 выделен из соленой части озера Балхаш (соленость воды 4 г/л) Республики Казахстан. Согласно предыдущим исследованиям, данный штамм способен быстро расти в широком диапазоне температур (24-39°C), что говорит о высоком адаптивном потенциале клеток. Способность расти в широком диапазоне температур является хорошим признаком для введения штамма в биотехнологический процесс, поскольку допускает отклонение суточной температуры культивирования в значительных пределах. Анализ жирнокислотного состава суммарных клеточных липидов показал, что штамм *Cyanobacterium* sp. имеет высокое содержание миристиновой (14:0) и миристоолеиновой кислот (14:0-14:1) (30% и 10% от суммы ЖК, соответственно) (Sarsekeyeva, 2014:1033). Подобный ЖК-состав является редкостью для цианобактерий и, одновременно, именно 14:0 и 14:1 ЖК являются потенциальными целевыми продуктами для производства биотоплива.

Целью настоящего исследования являлось проведение оптимизации методов экстракции

липидов для штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 – потенциального продуцента биодизеля.

Материалы и методы исследования

В качестве материала для исследований использовали коллекционный штамм цианобактерии *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200, депонированный в Коллекции микроводорослей Института физиологии растений Российской Академии Наук и Республиканской Коллекции микроорганизмов Комитета науки Министерства образования и науки РК.

Для культивирования цианобактерии использовали среду Заррука (Сиренко, 1975:248), выращивание проводили в условиях лабораторного люминистата в непрерывном режиме при искусственном освещении интенсивностью 50 мкЕ·м⁻²·с⁻¹ и температуре 26-30°C. Массовое культивирование опытного штамма проводили в фотобиореакторе (PBR, Латвия) объемом 6 л на среде Заррука, при температуре 30°C, постоянном освещении светом интенсивностью 110 мкЕ·м⁻²·с⁻¹ и аэрацией стерильной газо-воздушной смесью, обогащённой CO₂ до концентрации 1,5%. Рост культуры определяли по изменению оптической плотности на спектрофотометре PD – 303UV (Япония) при длине волны 750 нм. Концентрирование биомассы осуществлялось с помощью центрифуги 5810R (Eppendorf, Германия) при скорости вращения 5000 об./мин. Отгонка растворителя осуществлялась с помощью вакуумного ротационного испарителя IKA RV10 basic (Германия).

Определение сухого веса осуществляли в два этапа. На первом этапе определяли общий сухой вес (цианобактерии + соли) для этого Клетки осаждали центрифугированием при 5000 g. Культуру высушивали при 80°C в течение трех дней. После выпаривания и сушки материала чашки вновь взвешивали на аналитических весах и по разнице веса определяли общий сухой вес (г/л). На втором этапе сухой остаток заливали небольшим количеством дистиллированной воды. После полного растворения соли раствор перемешивали и вместе с нерастворимой частью помещали в мерную пробирку, где дистиллированной водой доводили до объема равного объему образца на первом этапе и далее подвергали центрифугированию. После центрифугирования отбирали часть раствора над осадком и тем же методом, что и для определения общего сухого веса, определяли сухой вес соли в исследуемом образце (г/л).

По разнице между общим сухим весом образца и сухим весом соли определили сухой вес цианобактерий (Сиренко, 1975:248). Погрешность высчитывали по формуле:

$$\Delta x = \frac{x_{max} - x_{min}}{2}$$

С целью подбора оптимального метода экстракции липидов из сухой биомассы цианобактерии были исследованы методами: 1) *Метод Фолча*. Сухую биомассу цианобактерии обрабатывали метанол-хлороформенной смесью в соотношении 1:2. Промывку экстракта от нелипидных компонентов осуществляли 0,9 %-й раствором NaCl. После расслоения фаз отделяли органическую фазу. Растворитель выпаривали и взвешивали осадок (Folch, 1957:497). 2) *Метод Блайя и Дайера*. Способ заключается в обработке сухой биомассы смесью хлороформ/метанол (1:2), получении липидного экстракта, промывке его смесью хлороформ/метанол/H₂O, и упаривании (Bligh, 1959:911). 3) *Метод, предложенный Харой и Радиным*. Сухую биомассу цианобактерии перемешивали в присутствии гексан-изопропаноловой смеси (3:2). Затем добавляли 70 мМ раствора сульфата натрия и перемешивали в течении 2 минут до достижения разделения фаз. После двухфазного разделения, отбирали легкую органическую фазу (гексан, содержащую большую часть липидов) и промывали. Гексан выпаривали на ротационном испарителе, осадок высушивали и взвешивали (Nara, 1978:420). Вес и концентрацию липидов в биомассе штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 определяли следующими уравнениями: Вес липидов = (вес контейнера+липидный экстракт) – вес контейнера. Концентрация липидов = количество экстрагированных липидов, г / 1 г сухой биомассы × 100%. Статистическую обработку данных эксперимента проводили в программе Excel 2013.

Результаты исследования и их обсуждение

В настоящее время накоплен значительный экспериментальный материал по экстракции липидной фракции из фототрофных микроорганизмов (Gopinath, 2014:2319; Kiaei, 2015:236). Установлено, что достаточно полная экстракция липидов может быть осуществлена, если применять смесь полярного и неполярного или слабополярного растворителя. Обычно используемый в качестве полярного компонента

спирт, который ослабляет прочность комплекса липиды – белки, что обеспечивает полноту экстракции неполярным растворителем. Эффективность экстракции в значительной мере зависит от степени разрушения клеточной структуры исследуемых объектов. Так к примеру классическим методом извлечения липидов является метод экстракции с использованием смеси хлороформ-метанол (1:1, по объему) разработанный в 1951 году Фолчем и другими, метод является быстрым и эффективным (Folch, 1957:497). Однако хлороформ обладает высокой токсичностью, и его использование нежелательно. По этой причине его эффективность при экстракции липидов из биомассы микроводорослей все еще нуждается в дальнейшей оценке. Также используется смесь с соотношением метанола и хлороформа 2:1 (об./об.) – метод Блайя и Дайера (Bligh, 1959:911). В качестве замены хлороформа используют дихлорметан в соотношении метанол-дихлорметан 1/2 (об./об.) – метод Чена (Chen, 2013:9). Смесь растворителей с низкой токсичностью гексан/изопропанол 3:2 (об./об.) предложена Харой и Радиным в качестве замены смеси хлороформ/метанол (Нага, 1978:420). Чистый спирт (например, бутанол, изопропанол и этанол) является дешевым летучим экстрагентом

и способен образовывать водородные связи с белково-липидными комплексами мембран из-за своей полярной природы. Однако, его полярная природа также является недостатком, поскольку ограничивает взаимодействие с автономными глобулами нейтральных липидов. Оказалось, что в зависимости от объекта и типа экстрагента, экстрагируемость варьирует от 3,7 до 10,4 % (Lee, 2010:75; Selvan, 2013:262). Это означает, что перед началом работы с каждым новым объектом в идеале необходимо подобрать оптимальный для него метод экстракции.

Перед началом эксперимента клетки *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 подращивали 3–4 суток в колбах в 200 мл жидкой среды Заррука, Подращенную культуру переносили в фотобиореактор со свежей средой Заррука и культивировали в течении 6-ти суток при оптимальных условиях. Начальная оптическая плотность суспензии штамма *Cyanobacterium* sp. B-1200 составляла $OP_{750} = 0,3$. Измерение оптической плотности исследуемой культуры проводилось каждые сутки.

Стационарную фазу роста опытный штамм *Cyanobacterium* sp. B-1200 достиг на 6-ые сутки. Кривые роста исследуемой культуры представлена на рисунке 1.

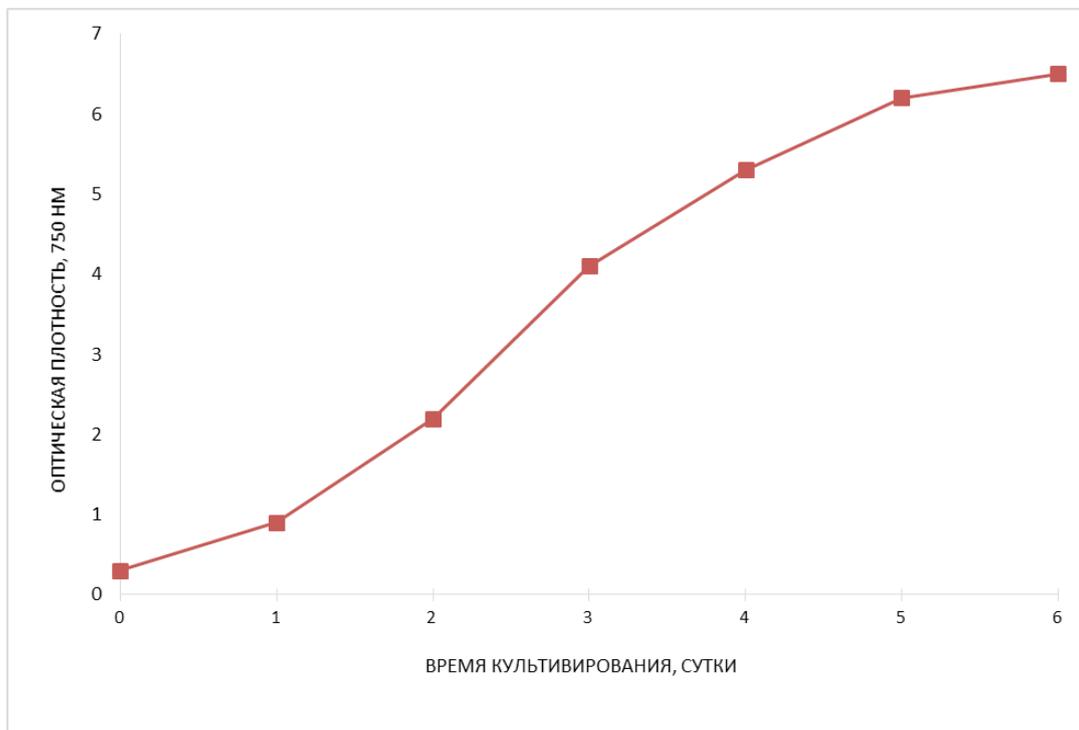


Рисунок 1 – Кривая роста штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200

На следующем этапе эксперимента плотную суспензию исследуемой культур, концентрировали с помощью центрифуги и высушивали. С целью оптимизации методов экстракции липидов, позволяющих извлечь их максимальное количество из биомассы цианобактерии *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 проводился сравнительный анализ трех методов экстракции липидов из биомассы цианобактерии: метод Фолча, метод Блайя и Дайера и метод, предложенный Харой и Радином, которые отличаются между собой использованием различных растворителей и в разных соотношениях. В качестве экстрагентов использовали следующие составы: хлороформ-метанол 2:1 (об/об); хлороформ-метанол 1:2 (об/об); гексан-изопропанол 3:2 (об/об). После окончания экстрагирования, экстракт и обезжиренную биомассу

разделяли центрифугированием. Экстракт представляет собой смесь три- и диацилглицеролов в органическом растворителе. После отгонки органического растворителя на вакуумном ротационном испарителе, липидная фракция поступает в реактор для проведения химического процесса получения компонентов биодизельного топлива. Обезжиренная биомасса содержит смесь остатков оболочек, клеточного белка и минеральных веществ, которые можно использовать в качестве белковой кормовой добавки. В результате экспериментов были получены данные, позволяющие вычислить концентрацию липидов на сухой вес биомассы штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200. Обобщенные данные по всем трем видам экстракции липидов из биомассы исследуемой цианобактерии представлены на рисунке 2.

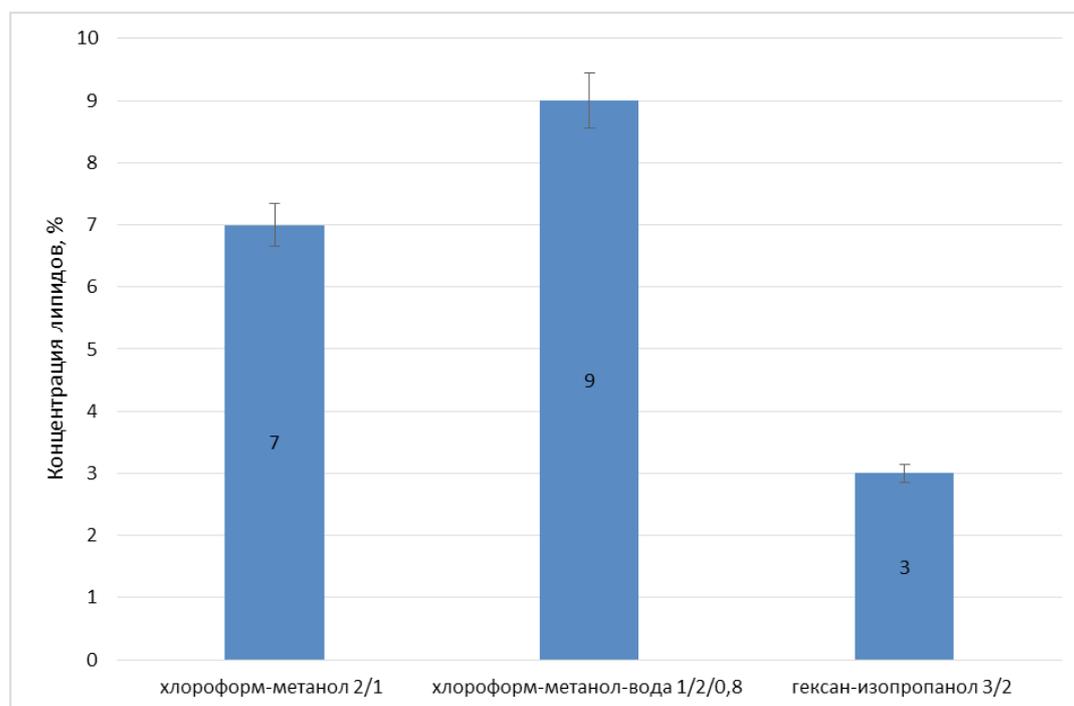


Рисунок 2 – Количество липидов при различных методах экстракции

Результаты опыта показали, что наибольший выход липидов 90 мг/г сухого вещества биомассы наблюдался при экстракции биомассы методом Блайя и Дайера, где использовали смесь хлороформ:метанол в соотношении 1:2. В то же время в присутствии других исследуемых методов экстракции липидов, данный показатель составлял для метода Фолча– 70 мг/г, а для метода

гексан/изопропанол – 30 мг/г сухого вещества биомассы. По результатам эксперимента можно сделать вывод, что наибольший выход липидов 9% от сухого вещества биомассы наблюдается при использовании в качестве экстрагента смеси хлороформ-метанол в соотношении 1:2, в то время как использование этой же смеси экстрагентов в соотношении 2:1, выход липидов составил

7%, а применение смеси экстрагентов гексан/изопропанол в соотношении 3:2 данный показатель составил 3% (Талпакова, 2017:112). Данный результат можно объяснить тем, что некоторые нейтральные липиды находятся в цитоплазме не только в виде липидных глобул, но и в качестве комплексов с полярными липидами. Эти комплексы тесно соединены водородными связями с белками клеточной мембраны. Ван-дер-Ваальсовое взаимодействие, возникающее между неполярным органическим растворителем и нейтральными липидами, которые находятся в составе белково-липидных комплексов, является недостаточным для того, чтобы разрушить взаимодействие между липидами и белками. Поэтому увеличение концентрации полярного

органического растворителя (такого как метанол) способствует нарушению липидно-белковых ассоциации путем образования водородных связей с полярными липидами, находящимися в комплексе.

При анализе полученных результатов можно сделать вывод, что экстракция методом Блайя и Дайера позволяет максимально извлечь липиды из биомассы штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200. Установлено, что экстракция липидов из клеток коллекционного штамма в присутствии хлороформ-метаноловой (1:2) смеси является оптимальной, что позволяет рекомендовать данный метод в производстве биодизеля на основе штамма цианобактерии *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200.

Литература

- 1 Al-Thani R.F, Potts M., Cyanobacteria, oil and cyanofuel? // Ecology of cyanobacteria II: their diversity in space and time, ed. Brian A. Whitton. – 2012. – P. 427–440.
- 2 Antoni D., Zverlov V.V., Schwarz W.H., Biofuels from microbes, // Appl Microbiol Biotechnol. – 2007. – V.77. – P. 23-35.
- 3 Bligh.E.G., Dyer.W.J., A rapid method for total lipid extraction and purification // Can.J.Biochem.Physiol., 1959. – V. 37. – P. 911- 917.
- 4 Chen S. etc. Simultaneous extraction of metabolome and lipidome with methyl tert-butyl ether from a single small tissue sample for ultra-high performance liquid chromatography/mass spectrometry // J Chromatogr A. – 2013. – V. 1298. – P. 9-16.
- 5 Chisti Y. Biodiesel from microalgae // Biotechnol Adv. – 2007– V. 25. – P. 94–306.
- 6 Da Rós P.C., Silva C.S., Silva-Stenico M.E., Fiore M.F. and De Castro H.F. Assessment of Chemical and Physico-Chemical Properties of Cyanobacterial Lipids for Biodiesel Production // Mar. Drugs. – 2013. – V. 11. – P. 2365-2381
- 7 Folch et al., A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J BiolChem. – 1957. – V. 226. – P. 497.
- 8 Gopinath. S. M, Ashalatha, Niruba J., Meghana .R . Isolation, Molecular Identification and Comparative Lipid Profiling of Microalgae and Cyanobacteria // IJSR. – 2014. – V. 3. – №7. – P. 2319-7064.
- 9 Griffiths M.; Harrison S. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production // J. Appl. Phycol. – 2009. – V. 21 – P. 493–507.
- 10 Hara A., Radin N.S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent // Analytical biochemistry. – 1978. – V. 90. – P. 420-426.
- 11 Kiaei, E. etc. Screening of Cyanobacterial Strains as a Smart Choice for Biodiesel // J. Appl. Environ. Biol. Sci. – 2015. – V. 5, №8. – P. 236-245.
- 12 Knothe G. Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition // Energy Environ. Sci. – 2009. – V. 2. – P. 759-766.
- 13 Krawczyk T., Biodiesel – alternative fuel makes inroads but hurdles remain, // Inform., – 1996. – V.7. – P.801-829.
- 14 Lang X., Dalai A.K., Bakhshi N.N., Reaney M.J., Hertz P.B. Preparation and characterization of bio-diesels from various bio-oils // Bioresour. Technol. – 2001. – V.806 № 1. – P.53-62.
- 15 Lee J.-Y., Yoo C., Jun S.-Y., Ahn C.-Y., Oh H.-M. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae // Bioresource Technology. -2010. – V. 101. № 1. – P. 75–77.
- 16 Li Q., Du W., Liu D., Perspectives of microbial oils for biodiesel production, // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – V.80. – P. 749-756.
- 17 Liu X., Fallon S., Sheng J., Curtiss R. CO₂-limitation-inducible green recovery of fatty acids from cyanobacterial biomass // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, – 2011. – V.108, № III. – P. 6905-6908.
- 18 Margulis L. Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof // Symp. Soc. Exp. Biol. – 1975. – P. 21-38.
- 19 Naik S.N., Goud V.V., Rout P.K., Dalai A.K. Production of first and second-generation biofuels: a comprehensive review // Renew Sustain Energy Rev. – 2010. – V.14. – P. 578–597.
- 20 Pahl G. Biodiesel. Growing a New Energy Economy // Chelsea Green Publishing. – 2010. – P. 298.
- 21 Pr'ibyl P., Cepa'k V., Zachleder V. Oil overproduction by means of microalgae // Cultivation of cells and products. – 2014. – V.1. – P. 241–273.

- 22 Sarsekeyeva F., Ussebaeva A., Zayadan B.K., Mironov K., Sidorov R., Kozlova A., Kupriyanova E., Sinetova M., Los D.A. Isolation and characterization of a new cyanobacterial strain with a unique fatty acid composition // *Advances In Microbiology*. – 2014.- V.4, №15.-P. 1033-1043.
- 23 Sarsekeyeva F., Zayadan B.K., Ussebaeva A., Bedbenov V.S., Sinetova M.A., Los D.A., Cyanofuels: biofuels from cyanobacteria: Reality and perspectives // *Photosynth. Res.* – 2015.-V. 125, №1-2.-P. 329-340.
- 24 Schenk P., Thomas-Hall S., Stephens E., Marx U., Mussgnug J., Posten C. et al. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production // *BioEnergy Res.* – 2008. – V.1. – P.20–43.
- 25 Selvan B.K., Revathi M., Piriya P.S., Vasan P.T. Biodiesel production from marine cyanobacteria cultured in plate and tubular photobioreactors // *Indian journal of experimental biology*.- 2013.-V. 51. – P. 262 – 268.
- 26 Steen E.J., et al. Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass // *Nature*. – 2010. – V.463.- P. 559–562.
- 27 Usui N., Ikenouchi M. The biological CO₂ fixation and utilization project by RITE(1) Highly-effective photobioreactor system // *Energy Convers Manage* – 1997.- V.38.-P. 487-492.
- 28 Лось Д.А. Десатуразы жирных кислот. – Москва: Научный мир.- 2014.- 370 с. ISBN:978-5-91522-391-1
- 29 Сиренко Л.А., Сакевич А.И. и др. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. – Киев: Наукова думка. – 1975. – 248 с.
- 30 Талпакова А.Е., Усербаева А.А. *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 штамм клеткасын липидтер экстракциялау алу // Материалы международной конференции студентов и молодых ученых «Фараби элеми» 10-11 апреля, Алматы. – 2017. – С. 112.

References

- 1 Al-Thani R.F, Potts M., (2012) Cyanobacteria, oil–and cyanofuel? Ecology of cyanobacteria II: their diversity in space and time, ed. Brian A. Whitton, pp. 427–440.
- 2 Antoni D., Zverlov V.V., Schwarz W.H. (2007) Biofuels from microbes, *Appl Microbiol Biotechnol.*, vol.77, pp. 23-35.
- 3 Bligh.E.G., Dyer.W.J., (1959) A rapid method for total lipid extraction and purification, *Can.J.Biochem.Physiol.*, vol.37, pp. 911- 917.
- 4 Chen S and etc. (2013) Simultaneous extraction of metabolome and lipidome with methyl tert-butyl ether from a single small tissue sample for ultra-high performance liquid chromatography/mass spectrometry, *J Chromatogr A.*, vol.1298: pp. 9-16.
- 5 Chisti Y. (2007) Biodiesel from microalgae, *Biotechnol Adv.*, vol. 25, pp. 94–306.
- 6 Da Rós P.C., Silva C.S., Silva-Stenico M.E., Fiore M.F. and De Castro H.F (2013) Assessment of Chemical and Physico-Chemical Properties of Cyanobacterial Lipids for Biodiesel Production, *Mar. Drugs*, vol.11, pp. 2365-2381.
- 7 Folch et al. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol.Chem.*, vol.226, pp. 497.
- 8 Gopinath. S.M, Ashalatha, Niruba J., Meghana .R. (2014) Isolation, Molecular Identification and Comparative Lipid Profiling of Microalgae and Cyanobacteria, *IJSR*, vol.3, no 7, pp. 2319-7064.
- 9 Griffiths M.; Harrison S. (2009) Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production, *J. Appl. Phycol.*, vol.21, pp.493–507.
- 10 Hara A., Radin N.S. (1978) Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent, *Analytical biochemistry*, vol.90, pp. 420-426.
- 11 Kiaei, E, etc. (2015) Screening of Cyanobacterial Strains as a Smart Choice for Biodiesel, *J. Appl. Environ. Biol. Sci.*, vol.5, no 8, pp.236-245.
- 12 Knothe G. (2009) Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition, *Energy Environ. Sci.*, vol.2, pp.759-766.
- 13 Krawczyk T. (1996) Biodiesel – alternative fuel makes inroads but hurdles remain, *Inform.*, vol.7, pp.801-829.
- 14 Lang X., Dalai AK, Bakhshi NN, Reaney MJ, Hertz PB. (2001) Preparation and characterization of bio-diesels from various bio-oils, *Bioresour Technol.*, vol.80, no 1, pp.53-62.
- 15 Lee J.-Y., Yoo C., Jun S.-Y., Ahn C.-Y., Oh H.-M. (2010) Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae, *Bioresour Technol.*, vol.101, no 1, pp. 75–77.
- 16 Li Q., Du W., Liu D. (2008) Perspectives of microbial oils for biodiesel production, *Appl Microbiol Biotechnol.*, vol.80, pp. 749-756.
- 17 Liu X., Fallon S., Sheng J., Curtiss R. (2011) CO₂-limitation-inducible green recovery of fatty acids from cyanobacterial biomass, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol.108, no III, pp. 6905-6908.
- 18 Los D.A. (2014) Десатуразы жирных кислот [Desaturases of fatty acids], Москва: Научный мир [Moscow: Scientific world], pp.370. ISBN: 978-5-91522-391-1.
- 19 Margulis L. (1975) Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof, *Symp. Soc. Exp. Biol.*, pp. 21-38.
- 20 Naik S.N., Goud V.V., Rout P.K., Dalai A.K. (2010) Production of first and second-generation biofuels: a comprehensive review, *Renew Sustain Energy Rev.*, vol.14, pp. 578–597.
- 21 Pahl G. (2010) Biodiesel. Growing a New Energy Economy, Chelsea Green Publishing, pp. 298.
- 22 Pr̄ibyl P., Cepa'k V., Zachleder V. (2014) Oil overproduction by means of microalgae, *Cultivation of cells and products*, vol.1, pp. 241–273.

- 23 Sarsekeyeva F., Ussebaeva A., Zayadan B.K., Mironov K., Sidorov R., Kozlova A., Kupriyanova E., Sinetova M., Los D.A. (2014) Isolation and characterization of a new cyanobacterial strain with a unique fatty acid composition, *Advances In Microbiology*, vol.4, no 15, pp. 1033-1043.
- 24 Sarsekeyeva F., Zayadan B.K., Ussebaeva A., Bedbenov V.S., Sinetova M.A., Los D.A., (2015) Cyanofuels: biofuels from cyanobacteria: Reality and perspectives, *Photosynth. Res.* vol.125, no 1-2, pp. 329-340.
- 25 Schenk P., Thomas-Hall S., Stephens E., Marx U., Mussgnug J., Posten C. et al. (2008) Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production, *BioEnergy Res.*, vol.1, pp. 20–43.
- 26 Selvan B.K., Revathi M., Piriya P.S., Vasan P.T. (2013) Biodiesel production from marine cyanobacteria cultured in plate and tubular photobioreactors, *Indian journal of experimental biology*, vol.51, pp. 262 – 268.
- 27 Sirenko L.A., Sakevich A.I., etc. (1975) *Metody fiziologo-biohimicheskogo issledovaniya vodorosley v gidrobiologicheskoy praktike* [Methods of physiological and biochemical study of algae in hydrobiological practice], Kiev:Naukova dumka [Kiev: Scientific thought], pp. 248.
- 28 Steen E.J., et al. (2010) Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass, *Nature*, vol.463, pp. 559–562.
- 29 Usui N, Ikenouchi M. (1997) The biological CO₂ fixation and utilization project by RITE(1) Highly-effective photobioreactor system. *Energy Convers Manage*, vol.38, pp. 487-492.
- 30 Талпақова А.Е., Усербаева А.А. (2017) *Сyanobacterium* sp. IPPAS В-1200 штамм клеткасынан липидтер экстракциялау алу, Материалы международной конференции студентов и молодых ученых «Фараби элемеі» 10-11 апреля, Алматы, С. 112.