

УДК 582.232:[581.143+577.122.5]

А. Б. Боровков, И. Н. Гудвилович

**РОСТОВЫЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ
DUNALIELLA SALINA В УСЛОВИЯХ
НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ**

Исследована динамика плотности, содержания хлорофилла *a*, хлорофилла *b*, суммарных каротиноидов и белка накопительной культуры *D. salina*. Рассчитаны кинетические характеристики дуналиеллы по биомассе, хлорофиллам, каротиноидам и белку. Показано, что для получения максимальной продуктивности накопительной культуры *D. salina* по биомассе клеток, белку и фотосинтетическим пигментам необходимо поддерживать рабочую плотность 1,5—3 г ОВ·л⁻¹.

Ключевые слова: *Dunaliella salina*, накопительное культивирование, удельная скорость синтеза, продуктивность, пигменты, белок.

Микроводоросли — источник целого ряда уникальных биологически ценных веществ, в частности пигментов [2, 13]. Хорошо известна зелёная микроводоросль *Dunaliella salina*, которая служит объектом массового культивирования для получения β-каротина и глицерина [4, 11, 12]. К особенностям *D. salina* можно отнести существование двух «физиологических форм» данной микроводоросли. В условиях, благоприятных для роста и размножения, клетки *D. salina* имеют зелёную окраску и содержат лишь около 0,3% β-каротина — столько же, сколько листья растений и клетки других некаротиноносных водорослей [5].

Выращивание дуналиеллы, обогащённой β-каротином, как правило, состоит из двух стадий: интенсивного роста культуры и накопления β-каротина [1, 4]. Первоначальный этап — получение культуры микроводоросли с максимальной плотностью — основа для производства любых ценных веществ. Осуществляется это обычно в накопительном режиме, который является самым простым из разработанных на сегодняшний день методов культивирования.

Целью работы являлось исследование ростовых и биохимических показателей интенсивной накопительной культуры *D. salina*.

Материал и методика исследований. Объект исследования — зелёная галофильная микроводоросль *Dunaliella salina* Teod. (штамм IBSS-2) из коллекции культур ИнБЮМ НАН Украины.

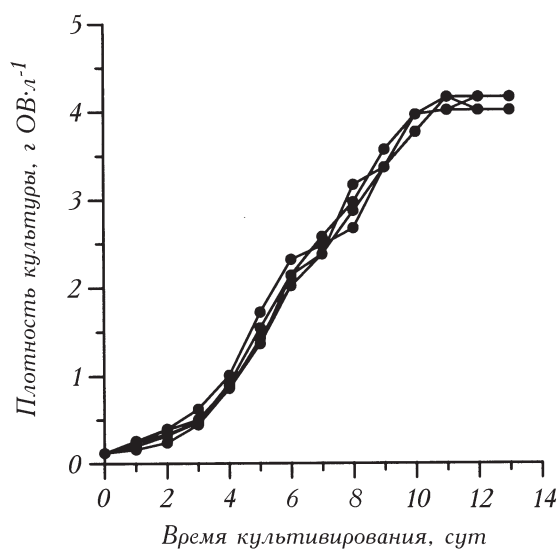
© А. Б. Боровков, И. Н. Гудвилович, 2012

Установка для культивирования микроводорослей состояла из пяти стеклянных фотобиореакторов плоскопараллельного типа объемом 6 л с рабочей толщиной 5 см, осветителя — лампы ДРЛ-700, термостабилизирующей и газораспределительной систем. Объем суспензии в каждом культиваторе поддерживался на уровне 5 л. Водоросли выращивали в накопительном режиме на модифицированной питательной среде Тренкеншу [6], для приготовления которой использовали стерилизованную морскую воду. В процессе выращивания культура непрерывно снабжалась газо-воздушной смесью с концентрацией углекислоты 3%, рН культуральной среды равнялось 6—7. Освещенность рабочей поверхности культиваторов — 80 Вт/м², температура — 26—28°C. В процессе эксперимента культуру *D. salina* выращивали накопительным методом.

Плотность культуры определяли объемно-весовым методом [8]. Содержание хлорофиллов *a* и *b*, содержание каротиноидов и общего белка определяли согласно методикам [15, 16].

Результаты исследований

Накопительное культивирование было организовано от первоначальной плотности культуры 0,12 г ОВ·л⁻¹. Накопительные кривые для всех пяти культиваторов были аналогичными и имели типичную S-образную форму (рис. 1), однако выраженная лаг-фаза отсутствовала в связи с высокой начальной плотностью культуры и её адаптированностью к установленным физическим условиям. На третьи сутки эксперимента культура перешла от экспоненциальной к линейной фазе роста, которая продолжалась по 9-е сутки; далее следовала фаза замедления роста, и культура достигла стационарной плотности на уровне 4,—4,3 г ОВ·л⁻¹ (см. рис. 1). Таким образом, за 11 сут плотность культуры увеличилась в 35 раз.



1. Динамика плотности накопительной культуры *D. salina*.

Начальная концентрация азота в среде составляла 198—200 мг·л⁻¹. В течение экспоненциальной фазы происходило ее незначительное уменьшение, а с началом линейной фазы роста концентрация азота интенсивно снижалась и на 8—9-е сутки достигала нулевых значений [3].

Для характеристики изменений физиологического состояния культуры *D. salina*, помимо определения ростовых показателей, исследовали динамику относительного содержания хлорофиллов *a* и *b*, каротиноидов и белка в биомассе. При этом наблюдали устойчивый рост отно-

сительного содержания всех исследованных пигментов и белка со вторых суток культивирования (рис. 2).

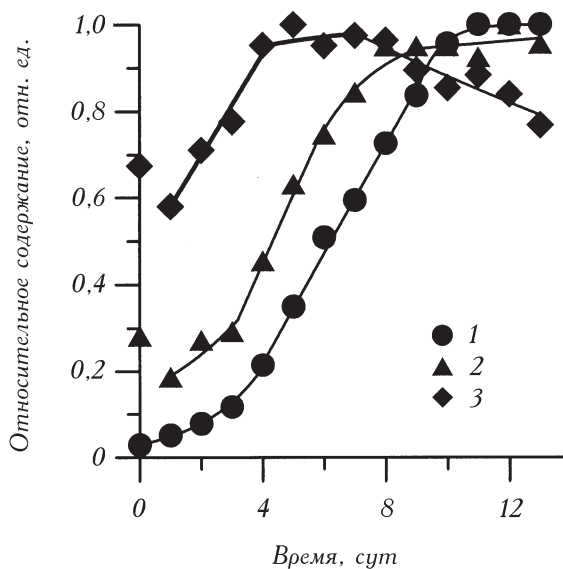
Массовые доли пигментов и белка при накопительном культивировании для всех вариантов на всех фазах роста практически совпадали, при этом содержание пигментов в первые сутки культивирования в среднем составило: хлорофилла *a* — $0,66 \pm 0,064\%$ ОВ, хлорофилла *b* — $0,10 \pm 0,055$, каротиноидов — $0,5 \pm 0,049$, белка — $26,3 \pm 2,53\%$ ОВ, а к началу стационарной фазы (на 10-е сутки) — хлорофилла *a* — $2,36 \pm 0,084$, хлорофилла *b* — $0,57 \pm 0,082$, каротиноидов — $0,90 \pm 0,032$, белка — $35,3 \pm 4,52\%$ ОВ.

Динамика содержания фотосинтетических пигментов и белка в накопительной культуре дуналиеллы имела вид S-образной кривой, в основном соответствуя накопительной кривой плотности культуры (см. рис. 2).

Обсуждение результатов исследований

В процессе роста водорослей при накопительном культивировании биомасса увеличивается до некоторой предельной величины, которая определяется лимитирующим фактором [6]. Очевидно, для данного эксперимента таким ограничивающим фактором (учитывая прирост биомассы) являлась концентрация неорганического азота. Продолжение роста дуналиеллы ещё в течение 2—3 сут после исчерпания нитратного азота в среде можно объяснить несколькими причинами. Прежде всего, следует указать на способность микроводорослей достаточно эффективно использовать, помимо нитратов, и другие источники азота [10, 14]. В данном случае это могут быть продукты бактериальной деструкции отмерших клеток дуналиеллы и ее собственные вторичные метаболиты (аминокислоты, низкомолекулярные пептиды). Кроме того, для роста культуры могли быть использованы внутриклеточные запасы азота.

Сроки начала стабилизации содержания хлорофиллов и каротиноидов совпадали, в основном, с моментом исчерпания в среде нитратов (8—9-е сут-



2. Динамика относительного содержания пигментов, белка и плотности культуры микроводоросли *D. salina*, нормированная по их максимальному содержанию: 1 — плотность культуры, хлорофилл *b*; 2 — хлорофилл *a*; каротиноиды; 3 — белок.

Кинетические характеристики синтеза биомассы клеток, хлорофилла *a*, хлорофилла *b*, белка и суммарного содержания каротиноидов накопительной культуры *Dunaliella salina*

Параметры	$\mu_m, \text{сут}^{-1}$	$\frac{P_m}{C_0}, \text{г}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$	$C_0, \text{г}\cdot\text{л}^{-1}$	$C_m, \text{г}\cdot\text{л}^{-1}$	$P, \text{г}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$
Биомасса	0,49	0,53	0,12	4,09	$0,33 \pm 0,015$
Белок	0,59	0,20	0,03	1,37	$0,12 \pm 0,013$
Хл <i>a</i>	0,64	0,0144	0,0008	0,0941	$0,009 \pm 0,0010$
Хл <i>b</i>	0,67	0,0039	0,0001	0,0260	$0,002 \pm 0,0002$
Каротиноиды	0,51	0,0044	0,0006	0,0369	$0,003 \pm 0,0031$

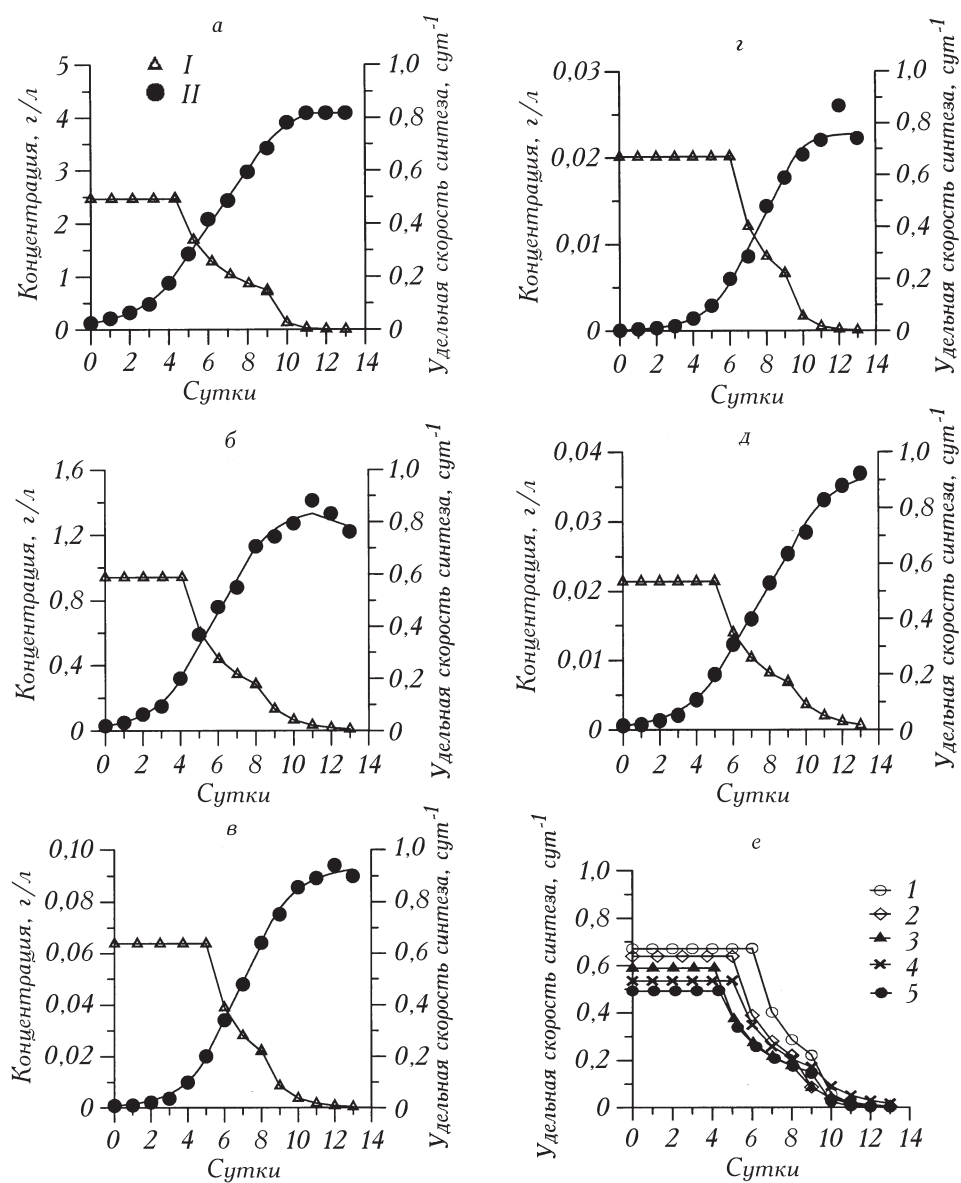
Примечание. μ_m — максимальная удельная скорость синтеза; P_m — максимальная продуктивность; P — средняя продуктивность за 11 сут накопительного культивирования; C_0 — концентрация на начало логарифмической фазы роста культуры; C_m — максимальная концентрация, соответствующая стационарной фазе роста культуры.

ки), однако относительное содержание белка к этому моменту уже начало снижаться.

Таким образом, максимум накопления хлорофилла *a*, суммы каротиноидов и белка в клетках *D. salina* не совпадает по времени с накоплением максимального количества хлорофилла *b* и биомассы культуры. При этом максимальное накопление белка по времени опережает на 4 сут наступление зарегистрированных максимумов для хлорофиллов *a*, *b*, суммарных каротиноидов и плотности культуры и соответствует середине линейной стадии роста накопительной культуры *D. salina* (см. рис. 2). Максимальное накопление в клетках дуналиеллы хлорофилла *a*, хлорофилла *b* и содержания каротиноидов соответствует фазе замедления роста накопительной культуры микроводоросли.

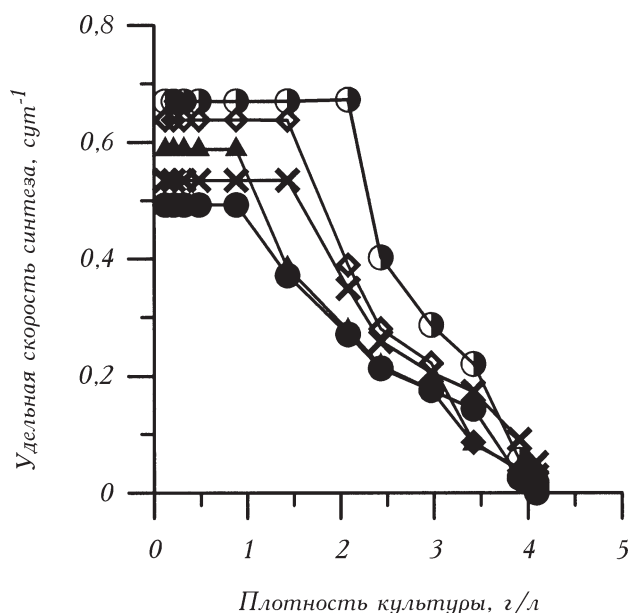
С помощью коэффициентов кинетических характеристик, полученных при аппроксимации экспериментальных данных, и простых уравнений для роста и биосинтеза [7, 9] рассчитаны основные кинетические характеристики синтеза биомассы клеток, хлорофилла *a*, хлорофилла *b*, белка и суммарного содержания каротиноидов (рис. 3, табл. 1).

При сравнении удельных скоростей синтеза пигментов, белка и собственно биомассы видно, что значения удельных скоростей синтеза близки, но диапазоны изменения концентрации пигментов и биомассы в культуре значительно отличаются. Так, абсолютные значения указанных показателей изменялись в следующих пределах: биомасса — в 34 раза, белок — в 45, суммарные каротиноиды — в 61, хлорофилл *a* — в 117, хлорофилл *b* — в 260 раз. Однако относительное содержание компонентов изменялось в значительно меньших пределах: в 1,7—5,8 раза. Наибольший диапазон изменения значений выявлен для относительного содержания хлорофилла *b* (увеличение в 5,8 раза) и хлорофилла *a* (увеличение в 5,4), в меньшей степени изменяется относительное содержание каротиноидов (увеличение в 2,9), минимальный диапазон варьирования зарегистрирован для относительного содержания белка (увеличение в 1,7 раза).



3. Динамика удельной скорости синтеза (II) биомассы (а) клеток микроводоросли *D. salina*, белка (б), хлорофилла а (в), хлорофилла б (г), каротиноидов (д) и их концентраций (I) в накопительной культуре, е — сравнение удельных скоростей синтеза. Здесь и на рис. 5, 6: 1 — биомасса; 2 — белок; 3 — хлорофилл а; 4 — хлорофилл б; 5 — каротиноиды.

Рассчитанные значения скорости синтеза для фотосинтетических пигментов и белка достаточно близки (см. табл. 1): минимальное значение для каротиноидов — 0,51 сут⁻¹, максимальное для хлорофилла б — 0,67 сут⁻¹, поэтому максимум накопления для белка, имеющего наименьший диапазон варьирования, по времени наступает раньше, чем для плотности культуры и относительного содержания пигментов (см. рис. 2).



4. Зависимость удельной скорости синтеза биомассы (1); белка (2); хлорофилла a (3); хлорофилла b (4) и каротиноидов (5) от плотности культуры *D. salina*.

Таким образом, можно предположить, что динамика концентрации фотосинтетических пигментов и белка в культуре *D. salina* определяется, в основном, диапазоном изменения относительного содержания соответствующих пигментов и белка в клетках микроводоросли, так как удельные скорости синтеза биомассы, фотосинтетических пигментов и белка близки. В процессе роста и развития культуры микроводоросли относительное содержание каждого биохимического компонента будет повторять динамику плотности культуры, но в связи с различным начальным

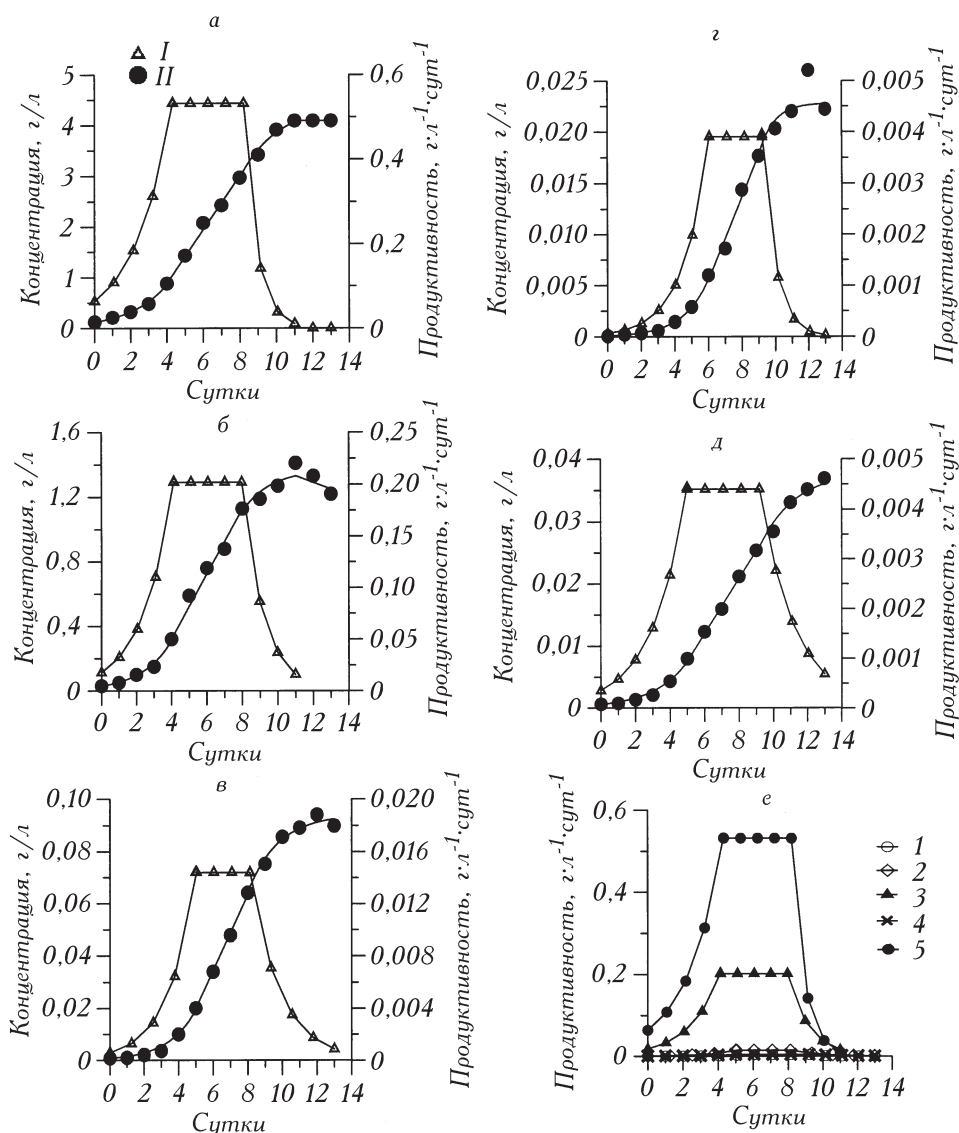
содержанием исследуемых компонентов будет достигать максимальных значений за различные промежутки времени.

Знание диапазонов варьирования и кинетических характеристик роста и биосинтеза позволяет прогнозировать содержание того или иного биохимического компонента клеток в любой момент времени.

Применение нескольких уравнений для описания удельных скоростей роста микроводорослей даёт некоторую неточность в точках перехода от одной фазы роста к следующей. Но данный способ отличается высокой точностью подбора коэффициентов уравнений и более простым математическим аппаратом.

Сравнение удельных скоростей синтеза относительно плотности культуры показывает, что при низкой плотности культуры, когда её рост не ограничен минеральным обеспечением, удельная скорость синтеза максимальна; впоследствии, при дальнейшем повышении плотности культуры удельные скорости синтеза снижаются, достигая нулевых значений при максимально возможной для данных условий плотности культуры (см. рис. 3).

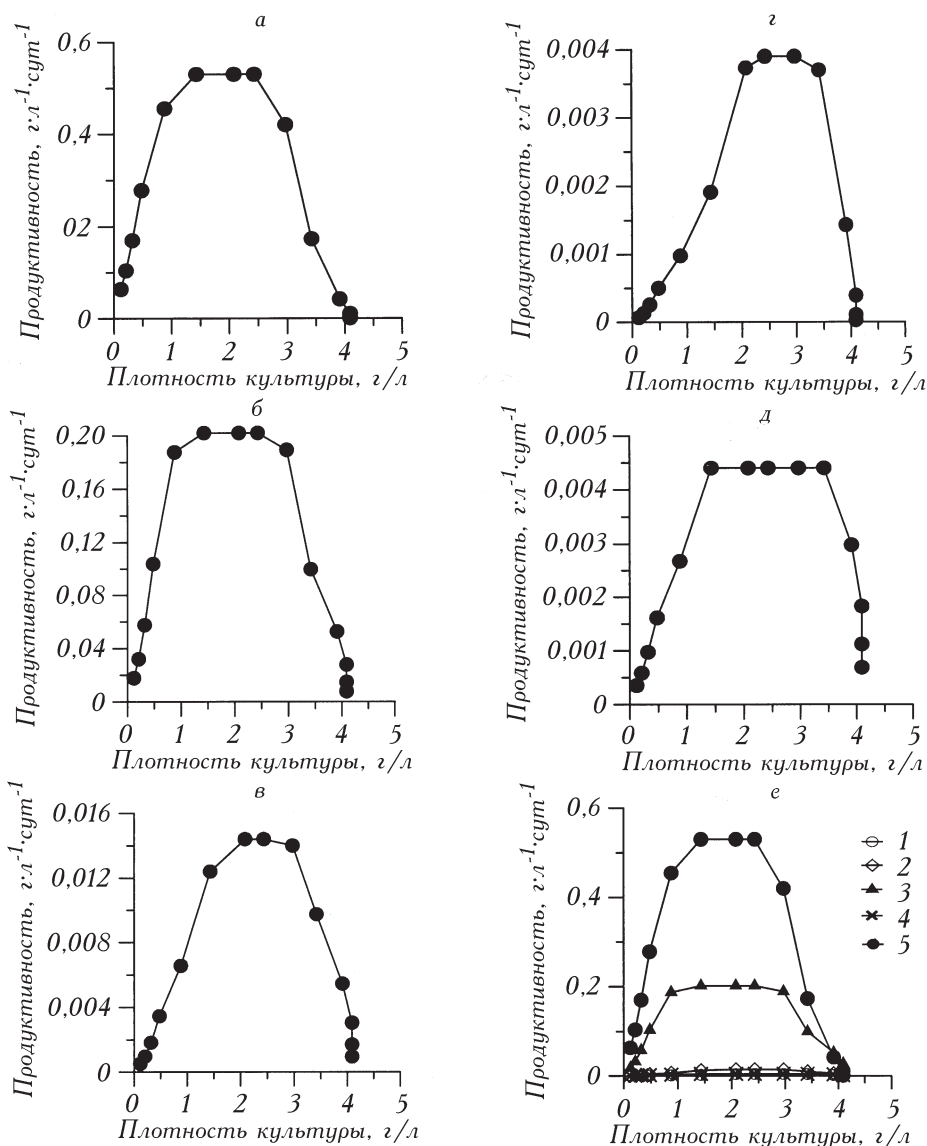
Таким образом, для получения культуры *D. salina* с максимальными удельными скоростями синтеза биомассы, пигментов и белка плотность культуры при накопительном культивировании (для условий данного эксперимента) должна находиться в пределах 0—1,0 г ОВ·л⁻¹, что соответствует логарифмической стадии роста (рис. 4).



5. Динамика продуктивности (I) накопительной культуры *D. salina* по биомассе (а), белку (б), хлорофиллу а (в), хлорофиллу б (г) каротиноидам (д) и их концентраций (II); е — сравнение продуктивности.

При промышленном выращивании микроводорослей наибольший интерес вызывает не удельная скорость синтеза биохимических компонентов, а значения продуктивности (рис. 5, б), поскольку возможно на базе данной характеристики прогнозировать, какое количество вещества можно получить с единицы объема суспензии за единицу времени.

Расчитанные значения продуктивности в соответствии с теорией роста микроводорослей [7] показывают, что продуктивность для биомассы, всех фотосинтетических пигментов и белка максимальна и постоянна на линейном участке накопительной кривой (см. рис. 5, б).



6. Зависимость продуктивности накопительной культуры *D. salina* по биомассе (а), белку (б), хлорофиллу а (в), хлорофиллу б (г) и каротиноидам (д) от плотности культуры; е — сравнение продуктивности.

Экспериментально показано, что максимальная продуктивность культуры *D. salina* по биомассе, белку и фотосинтетическим пигментам соответствует диапазону плотности культуры 1,5—3, г ОВ·л⁻¹ (см. рис. 6). Данный диапазон рабочей плотности может быть рекомендован при культивировании *D. salina* с целью получения максимальных количеств биомассы, белка и фотосинтетических пигментов.

Таким образом, при организации биотехнологического производства *D. salina* с использованием накопительного культивирования нет необходимости реализовывать полностью классическую S-образную накопительную культуру, так как на фазах замедления и стационарной скорости синтеза белка, хлорофилла *a*, хлорофилла *b*, суммарных каротиноидов и биомассы падает до нуля.

Заключение

На основании полученных данных по динамике плотности культуры *D. salina*, содержания фотосинтетических пигментов и белка, показано, что её культивирование в накопительном режиме на питательной среде Тренкеншу позволяет получать культуру с высокими как абсолютными, так и относительными скоростями роста. Максимальное относительное содержание белка зарегистрировано на середине линейной стадии роста накопительной культуры *D. salina*, а максимальное накопление в клетках дуналиеллы хлорофилла *a*, хлорофилла *b* и суммарных каротиноидов соответствует фазе замедления роста накопительной культуры микроводоросли. Удельные скорости синтеза для фотосинтетических пигментов и белка на экспоненциальной фазе роста культуры *D. salina* достаточно близки и находятся в диапазоне 0,51—0,67 сут⁻¹.

Максимальная продуктивность культуры *D. salina* по биомассе клеток, белку, хлорофиллу *a* и хлорофиллу *b* для данных условий накопительного культивирования находится в диапазоне плотности культуры 1,5—3,0 г ОВ л⁻¹. Данный диапазон плотности культуры *D. salina* рекомендуется при организации культивирования с целью получения максимальной продукции биомассы, фотосинтетических пигментов и белка. При организации производства микроводорослей с применением накопительного культивирования не рекомендуется реализовывать классическую S-образную кривую роста культуры, так как на фазах замедления и стационарной абсолютная скорость синтеза биохимических компонентов и биомассы падает до нуля.

**

Досліджено динаміку щільності, вмісту хлорофілу a, хлорофілу b, сумарних каротиноїдів і білка накопичувальної культури D. salina. Розраховано кінетичні характеристики D. salina за біомасою, хлорофілом a, хлорофілом b, каротиноїдами і білком. Показано, що для отримання максимальної продуктивності накопичувальної культури D. salina за біомасою, білком і фотосинтетичними пігментами необхідно підтримувати роботу щільність 1,5—3,0 г ОВ·л⁻¹.

**

The dynamics of biomass density, chlorophyll a and chlorophyll b, total carotenoids and protein content of batch culture D. salina were investigated. The kinetic characteristics of D. salina culture on biomass, chlorophyll a, chlorophyll b, total carotenoids and protein were calculated. It was shown that to maximize the productivity of the biomass, protein and photosynthetic pigments in batch culture D. salina, it is necessary to exchange the biomass density 1,5—3, g OS·l⁻¹.

**

1. Боровков А. Б. Динамика пигментов и роста микроводорослей в хемостате на примере *Dunaliella salina* Teod.: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Севастополь, 2008. — 28 с.
2. Ефремова Н. Разработка способов получения антиоксидантных препаратов на основе биоактивных веществ цианобактерий и микроводорослей: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. — Кишинёв, 2009. — 29 с.
3. Лелеков А. С. Моделирование роста и биосинтеза морских микроводорослей в квазинепрерывной культуре: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Севастополь, 2009. — 26 с.
4. Масюк Н. П. Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода *Dunaliella* Teod. — Киев: Наук. думка, 1973. — 487 с.
5. Масюк Н. П., Посудин Ю. И., Лилицкая Г. Г. Фотодвижение клеток *Dunaliella* Teod. (*Dunaliellales*, *Chlorophyceae*, *Viridiplantae*). — Киев: Академперіодика, 2007. — 264 с.
6. Тренкеншу Р. П. Ростовые и фотоэнергетические характеристики морских микроводорослей в плотной культуре: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Красноярск, 1984. — 28 с.
7. Тренкеншу Р. П. Простейшие модели роста микроводорослей II. Периодическая культура // Экология моря. — 2005. — Вып. 67. — С. 89—97.
8. Тренкеншу Р. П., Белянин В. Н. Влияние элементов минерального питания на продуктивность водоросли *Platymonas viridis* Rouch. // Биология моря. — 1979. — № 51. — С. 41—46.
9. Уильямсон М. Анализ биологических популяций / Под ред. Ю. М. Свирижева. — М.: Мир, 1975. — 271 с.
10. Упитис В. В. Макро- и микроэлементы в оптимизации минерального питания микроводорослей. — Рига: Зинатне, 1983. — 320 с.
11. Ben-Amotz A., Avron M. The potential use of *Dunaliella* for the production of glycerol, b-carotene and high protein feed // Biosaline Research: A Look to the Future: Plenum Publ. Corp., San-Pietro. — New York, 1982. — P. 207—214.
12. Ben-Amotz A., Shaish A., Avron M. Mode of action of the massively accumulated β -carotene of *Dunaliella bardawil* in protecting the algae against damage by excess irradiation // Plant. Physiol. — 1989. — Vol. 91, N 3. — P. 1040—1043.
13. Borowitzka M. A. Microalgae as sources of fine chemicals // Microbiol. Sci. — 1986. — Vol. 3. — P. 5—372.
14. Lévassieur M., Thompson P. A., Harrison P. J. Physiological acclimation of marine phytoplankton to different nitrogen sources // J. Phycol. — 1993. — Vol. 29. — P. 587—595.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
16. Wettstein D. Chlorophyll-letale und der submikroskopische Formwechsel der Plastiden // Exper. Cell Res. — 1957. — Vol. 12, N 3. — P. 427—506.