

А. С. ЛЕЛЕКОВ, И. Н. ГУДВИЛОВИЧ

**ПРОДУКЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РОСТА И БИОСИНТЕЗА  
КВАЗИНЕПРЕРЫВНОЙ КУЛЬТУРЫ ЗЕЛЁНОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ  
*DUNALIELLA SALINA* TEOD.**

Исследована динамика плотности, содержания хлорофилла *a* и белка квазинепрерывной культуры *Dunaliella salina*. На этапе накопительной культуры рассчитаны продукционные характеристики дуналиеллы по биомассе, хлорофиллу *a* и белку, с помощью которых построены прогностические кривые относительного содержания хлорофилла *a* и белка. Показано, что для получения максимальной продуктивности по биомассе клеток, белку и фотосинтетическим пигментам в квазинепрерывной культуре *D. salina* необходимо осуществлять обмен среды около 30 % от объёма.

**Ключевые слова:** *Dunaliella salina*, продуктивность, математическая модель, хлорофилл, белок.

Зеленая одноклеточная водоросль *Dunaliella salina* – объект массового промышленного культивирования для получения витаминов, липидов, спиртов (в частности, этанола) и антибиотиков [6]. Биомасса активно растущей микроводоросли *D. salina*, по данным многих авторов, имеет сбалансированный биохимический состав, характерный для большинства зелёных водорослей (содержание белка до 60 %, углеводов – 8,40 – 12,70 %, липидов – 7,70 – 10,80 %) [6, 9]. Содержание ценного пигмента хлорофилла *a* может достигать свыше 5 % на абсолютно сухую массу [1].

Клетки *D. salina* лишены целлюлозной или пектиновой оболочки и окружены лишь тонкой эластичной протоплазматической мембраной (плазмалеммой), что существенно облегчает усвоение биомассы водоросли. Благодаря этим ценным качествам, биомасса *D. salina* широко применяется в качестве кормовых добавок [6, 9]. По мнению многих исследователей, данная микроводоросль является модельным объектом для исследования механизмов устойчивости к действию различного рода факторов, благодаря уникальной способности выдерживать широкую амплитуду экстремальных значений различных абиотических факторов (общей солености, содержания и соотношения отдельных осмотически действующих и биогенных элементов, температуры, освещенности) [1, 3]. Наиболее значимыми факторами, оказывающими влияние на ростовые и биохимические характеристики культур микроводорослей, являются световое и минеральное обеспечение. Используя квазинепрерывный метод культивирования и варьируя удельную скорость протока среды, можно получать биомассу дуналиеллы с различным биохимическим составом, и, в первую очередь, с различным содержанием пигментов.

Цель работы – прогностическая оценка содержания белка и хлорофилла *a* в квазинепрерывной культуре *D. salina*, а также выявление условий для получения культуры *D. salina* с максимальными продукционными характеристиками.

**Материал и методы.** 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, для приготовления которой использовали стерилизованную морскую воду. В процессе вы-

© А. С. Лелеков, И. Н. Гудвилевич, 2010

ращивания культура непрерывно снабжалась газо-воздушной смесью с концентрацией углекислоты 3 %, рН культуральной среды составляла 6 – 7 единиц. Освещенность рабочей поверхности культиваторов – 80 Вт/м<sup>2</sup>, температура – 26 – 28 °С.

На начальном этапе эксперимента культуру *D. salina* выращивали накопительным методом в четырех культиваторах (далее варианты А, В, С и D). Начиная с 13 дня, эксперимент продолжили в квазинепрерывном режиме. Для варианта А была установлена удельная скорость протока  $\omega = 0,12 \text{ сут}^{-1}$ , для варианта В –  $\omega = 0,14 \text{ сут}^{-1}$ , для варианта С –  $\omega = 0,32 \text{ сут}^{-1}$ , для варианта D –  $\omega = 0,42 \text{ сут}^{-1}$ .

Плотность культуры определяли объемно-весовым методом [4]. Содержание хлорофилла а и общего белка определяли согласно методикам [7, 8].

**Результаты и обсуждения.** Ранее нами предложена модель динамики содержания некоторых биохимических компонентов [2, 5] на этапе непрерывной культуры:

$$\beta = 100 \cdot \frac{\frac{\rho_m}{\omega} - (\frac{\rho_m}{\omega} - b_n) \cdot \exp(-\omega \cdot t)}{\frac{P_m}{\omega} - (\frac{P_m}{\omega} - B_n) \cdot \exp(-\omega \cdot t)}, \quad (1)$$

где  $\beta$  – относительное содержание хлорофилла а (белка) в биомассе;  $\rho_m$  и  $P_m$  – максимальные продуктивности по хлорофиллу а (белку) и биомассе;  $b_n$  и  $B_n$  – концентрация хлорофилла а (белка) и биомассы в момент начала обмена с удельной скоростью  $\omega$ .

В табл. 1 представлены кинетические характеристики накопительной культуры *D. salina* рассчитанные на линейной фазе роста.

**Таблица 1. Значения максимальной продуктивности по биомассе ( $P_m$ ), хлорофиллу а ( $\rho_m^{chl a}$ ), белку ( $\rho_m^b$ ) и значения плотности культуры ( $B_n$ ), концентрации хлорофилла а ( $b_n^{chl a}$ ) и белка ( $b_n^b$ ) в момент начала квазинепрерывного режима**

**Table 1. The values of the maximal productivity on biomass ( $P_m$ ), chlorophyll a ( $\rho_m^{chl a}$ ), protein ( $\rho_m^b$ ) and the values of cell density ( $B_n$ ), concentrations of chlorophyll a ( $b_n^{chl a}$ ) and protein ( $b_n^b$ ) in the moment of the beginning of semicontinuous mode**

Вариант	$P_m$ , г ОВ/л · сут	$B_n$ , г ОВ	$\rho_m^{chl a}$ , мг/л · сут	$\rho_m^b$ , г/л · сут	$b_n^{chl a}$ , мг/л	$b_n^b$ , г/л
А	0,49	4,01	11,4	0,27	72,97	1,09
В	0,5	4,16	11,8	0,25	72,24	1,09
С	0,5	4,16	10,6	0,3	75,84	1,14
Д	0,48	4,01	10,4	0,27	76,88	1,4

Приведённые значения ростовых коэффициентов ( $P_m$ ,  $\rho_m^{chl a}$ ,  $\rho_m^b$ ), а также заданные начальные условия ( $B_n$ ,  $b_n^{chl a}$ ,  $b_n^b$ ) подставим в уравнение (1). В результате получим прогностические кривые динамики относительного содержания хлорофилла а на квазинепрерывном этапе при различных скоростях протока  $\omega$ . Для варианта А получим следующую зависимость:

$$\beta = 0,1 \cdot \frac{\frac{11,4}{0,12} - (\frac{11,4}{0,12} - 72,97) \cdot \exp(-0,12 \cdot (t-13))}{\frac{0,49}{0,12} - (\frac{0,49}{0,12} - 4,01) \cdot \exp(-0,12 \cdot (t-13))}.$$

Для варианта В:

$$\beta = 0,1 \cdot \frac{\frac{11,6}{0,14} - (\frac{11,6}{0,14} - 72,24) \cdot \exp(-0,14 \cdot (t-13))}{\frac{0,5}{0,14} - (\frac{0,5}{0,14} - 4,16) \cdot \exp(-0,14 \cdot (t-13))}.$$

Для варианта С:

$$\beta = 0,1 \cdot \frac{\frac{10,8}{0,32} - (\frac{10,8}{0,32} - 75,84) \cdot \exp(-0,32 \cdot (t-13))}{\frac{0,5}{0,32} - (\frac{0,5}{0,32} - 4,16) \cdot \exp(-0,32 \cdot (t-13))}.$$

Для варианта D:

$$\beta = 0,1 \cdot \frac{\frac{10,4}{0,42} - (\frac{10,4}{0,42} - 76,88) \cdot \exp(-0,42 \cdot (t-13))}{\frac{0,48}{0,42} - (\frac{0,48}{0,42} - 4,01) \cdot \exp(-0,42 \cdot (t-13))}.$$

Полученные теоретические кривые и их соответствие с экспериментальными точками представлены на рис. 1.

Для построения прогностических кривых динамики относительного содержания белка в биомассе квазинепрерывной культуры *D. salina* были проведены аналогичные расчёты. Для варианта А получим:

$$\beta = 100 \cdot \frac{\frac{0,25}{0,12} - (\frac{0,25}{0,12} - 1,09) \cdot \exp(-0,12 \cdot (t-14))}{\frac{0,49}{0,12} - (\frac{0,49}{0,12} - 4,01) \cdot \exp(-0,12 \cdot (t-14))}.$$

Для варианта В:

$$\beta = 100 \cdot \frac{\frac{0,27}{0,14} - (\frac{0,27}{0,14} - 1,09) \cdot \exp(-0,14 \cdot (t-14))}{\frac{0,5}{0,14} - (\frac{0,5}{0,14} - 4,16) \cdot \exp(-0,14 \cdot (t-14))}.$$

Для варианта С:

$$\beta = 100 \cdot \frac{\frac{0,3}{0,32} - (\frac{0,3}{0,32} - 1,14) \cdot \exp(-0,32 \cdot (t-14))}{\frac{0,5}{0,32} - (\frac{0,5}{0,32} - 4,16) \cdot \exp(-0,32 \cdot (t-14))}.$$

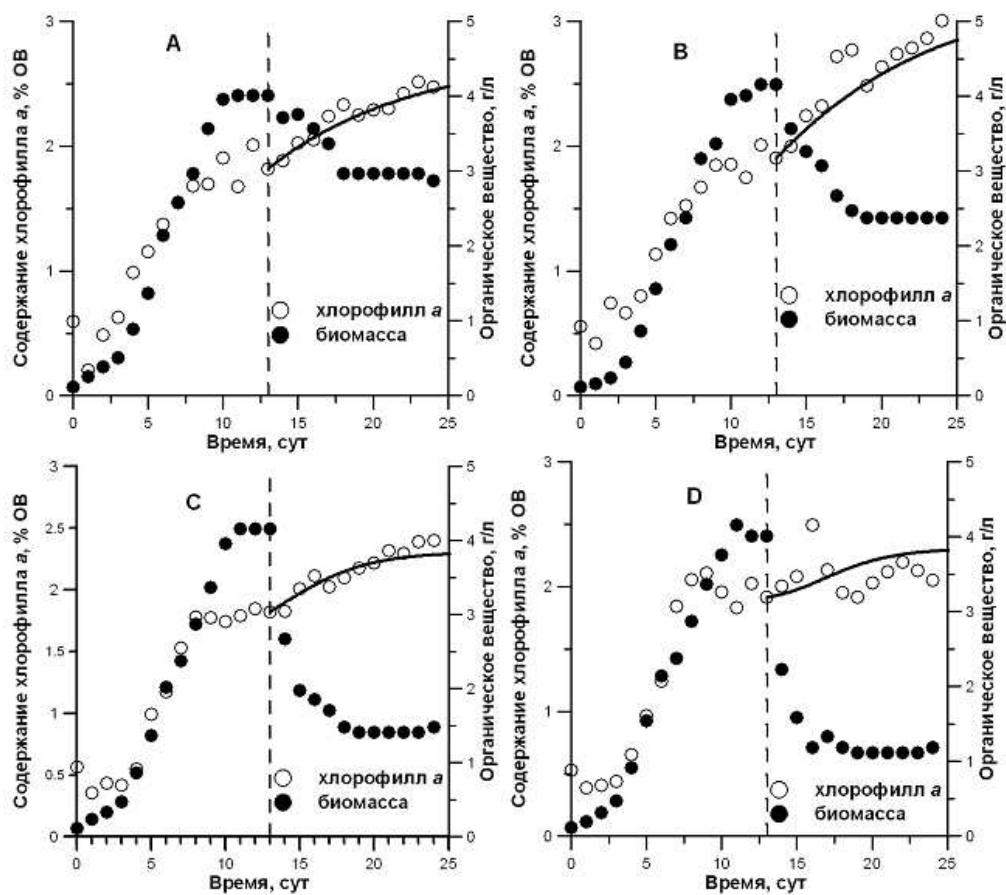


Рисунок 1. Динамика относительного содержания хлорофилла *a* культуры *D. salina*. Пунктирная линия – момент включения протока. Соответствие теоретических кривых и экспериментальных данных на этапе квазинепрерывной культуры для различных скоростей протока (варианты А – D).

Figure 1. Dynamics of relative content of chlorophyll *a* in *D. salina* culture. The dotted line is a moment of the beginning semicontinuous mode. The accordance of theoretical curves and experimental data for semicontinuous mode for different dilution rates (variants A – D).

Для варианта D:

$$\beta = 100 \cdot \frac{\frac{0,27}{0,42} - \left(\frac{0,27}{0,42} - 1,4\right) \cdot \exp(-0,42 \cdot (t-14))}{\frac{0,48}{0,42} - \left(\frac{0,48}{0,42} - 4,01\right) \cdot \exp(-0,42 \cdot (t-14))}$$

Полученные расчётные кривые и их соответствие с экспериментальными данными представлены на рис. 2.

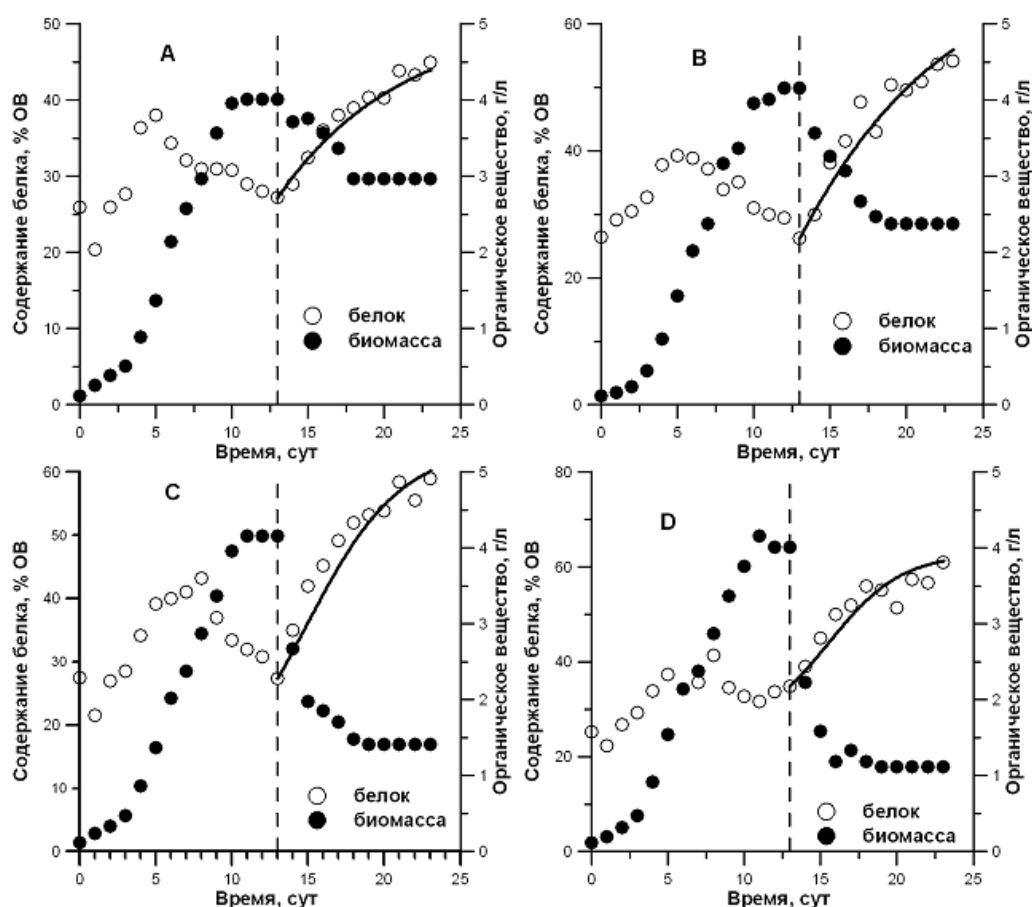


Рисунок 2. Динамика относительного содержания белка культуры *D. salina*. Пунктирная линия – момент включения протока. Соответствие теоретических кривых и экспериментальных данных на этапе квазинепрерывной культуры для различных скоростей протока (варианты А – D).  
 Figure 2. Dynamics of relative content of protein in *D. salina* culture. The dotted line is a moment of the begining semicontinuous mode. The accordance of theoretical curves and experimental data for semicontinuous mode for different dilution rates (variants A – D).

Таким образом, верификация предложенной модели показала высокое соответствие теоретических кривых с экспериментальными данными относительного содержания хлорофилла *a* и белка. Это свидетельствует о том, что рассчитанные на линейной фазе накопительной кривой значения максимальных продуктивностей по биомассе и хлорофиллу *a* (белку) остаются постоянными при культивировании дуналиеллы в режиме хемостата. Поэтому предлагаемая модель может быть использована для оценки величины относительного содержания хлорофилла *a* (белка) при выращивании *D. salina* в квазинепрерывной культуре при различных скоростях протока. Однако при использовании данной модели необходимо строго соблюдать условие линейности роста культуры микроводорослей. В противном случае продуктивности культуры микроводоросли по биомассе, белку и хло-

рофиллу *a* будут ниже максимальных, поэтому возможны отклонения теоретических и реальных экспериментальных результатов.

Проведём сравнения значений теоретической и экспериментальной производительности по хлорофиллу *a* и белку для четырёх опытных вариантов. Теоретическую производительность определим как произведение максимальной продуктивности на объём культиватора, который в нашем случае равен 5 л:

$$P_{chl}^{teor} = \rho_m^{chl a} \cdot V = 5 \rho_m^{chl a},$$

$$P_{bel}^{teor} = \rho_m^{bel} \cdot V = 5 \rho_m^{bel}.$$

Экспериментальная производительность равна произведению содержания хлорофилла *a* (белка) на объём сливаемой суспензии, который равен произведению удельной скорости протока на объём культиватора:

$$P^{real} = C \cdot V \cdot \omega = 5 \cdot C \cdot \omega,$$

где *C* – среднее за последние три дня значение содержания хлорофилла *a* (белка).

Сравнение теоретической и экспериментальной производительности проведём по величине относительного отклонения:

$$\Delta P = \sqrt{\frac{(P^{teor} - P^{real})^2}{P^{teor}}} \cdot 100\%.$$

Результаты расчётов, представленные в табл. 2, показывают, что при малых скоростях протока (варианты А и В) значения теоретической и экспериментальной производительности отличаются на 19 - 24 % для хлорофилла *a* и на 27 - 42 % для белка.

**Таблица 2. Значения теоретической ( $P^{teor}$ ) и экспериментальной ( $P^{real}$ ) производительности по хлорофиллу *a* и белку, относительного отклонения ( $\Delta P$ ) четырёх опытных культиваторов квазинепрерывной культуры *D. salina***

**Table 2. The values of the teoretical ( $P^{teor}$ ) and experimental ( $P^{real}$ ) efficiency of chlorophyll *a* and protein, relative deviation ( $\Delta P$ ) of semicontinuous *D. salina* culture in four experimental cultivators**

Вариант	$P_{chl}^{teor}$ , мг/сут	$P_{chl}^{real}$ , мг/сут	$\Delta P_{chl}$ , %	$P_{bel}^{teor}$ , г/сут	$P_{bel}^{real}$ , г/сут	$\Delta P_{bel}$ , %
А	57,00	43,58	24	1,35	0,79	42
В	59,00	48,03	19	1,25	0,91	27
С	53,00	54,32	2	1,50	1,28	15
Д	52,00	47,62	8	1,35	1,32	2

Для вариантов С и Д, характеризующихся большими значениями удельной скорости протока, величина относительного отклонения составляет всего 2 - 8 % для хлорофилла *a* и на 2 - 15 % для белка. Это свидетельствует о том, что рост дуналиеллы в вариантах А и В значительно отличается от линейного закона. Полученные значения теоретической производительности превышают реальные экспериментальные значения. При такой плотности культура микроводоросли, вероятно, находится в фазе замедления роста, которая характеризуется наличием минерального и светового лимитирования, поэтому реальная продуктивность (табл. 3) ниже максимальной (табл. 1).

Стоит отметить, что значения коэффициента относительного отклонения для белка (около 40 %) больше, чем для хлорофилла *a* (около 20 %) при минимальной удельной скорости

сти протока (вариант А). Это можно объяснить лимитированием роста дуналиеллы минеральным азотом: нехватка азота, в первую очередь, приводит к снижению скорости синтеза белка, и только потом влияет на содержание пигментов. Чем меньше удельная скорость протока, тем меньше концентрация минерального азота в среде и тем сильнее ограничение скорости роста. При увеличении удельной скорости протока всего на 2 % (вариант А – 12 %, вариант В – 14 %) значения коэффициента отклонения уменьшились на 5 (для хлорофилла), 15 % (для белка), что свидетельствует об увеличении скорости роста дуналиеллы (табл. 3).

**Таблица 3. Продуктивность культуры *D. salina* по биомассе, хлорофиллу *a* и белку при квазинепрерывном режиме культивирования**  
**Table 3. The productivity of the *D. salina* culture on biomass, chlorophyll *a* and protein on semicontinuous growth mode**

Удельная скорость протока, сут <sup>-1</sup>	Продуктивность		
	Биомасса, г ОВ·л <sup>-1</sup> ·сут <sup>-1</sup>	Хл <i>a</i> , мг·л <sup>-1</sup> ·сут <sup>-1</sup>	Белок, мг·л <sup>-1</sup> ·сут <sup>-1</sup>
0,12	0,36	10,13	152,4
0,14	0,33	10,72	176,4
0,32	0,45	12,72	249,6
0,42	0,48	11,29	256,2

Анализируя полученные значения коэффициентов отклонения для вариантов С и D, мы видим, что наибольшее значение коэффициента отклонения для хлорофилла составляет 8 %, а для белка – 15 %, что находится в пределах ошибки измерения. Т. е. данный диапазон плотностей квазинепрерывной культуры *D. salina* соответствует линейной фазе роста, поэтому скорость роста будет близка к величине максимальной продуктивности. Снижение продуктивности фотосинтетических пигментов при максимальной удельной скорости протока среды (0,42 сут<sup>-1</sup>) для исследованного диапазона, вероятно, связано с усиливающимися процессами фотодеструкции пигментов при возрастающей облучённости с уменьшением плотности культуры. Это подтверждается отсутствием аналогичной динамики для продукции биомассы и содержания белка дуналиеллы. Для заданных условий культивирования оптимальным можно считать квазинепрерывный режим с удельной скоростью протока среды около 0,3 сут<sup>-1</sup>. Данный режим способен обеспечить максимальную продуктивность культуры *D. salina* по биомассе, хлорофиллу *a* и белку.

**Выводы. 1.** Расчёт кинетических характеристик роста накопительной культуры *D. salina* позволяет прогнозировать динамику содержания хлорофилла *a* и белка в квазинепрерывной культуре при различных удельных скоростях протока. **2.** Показана принципиальная возможность регулирования относительного содержания пигментов и белка при квазинепрерывном культивировании с помощью варьирования удельной скорости протока среды. **3.** Для получения максимальной продуктивности по биомассе клеток, белку и фотосинтетическим пигментам в квазинепрерывной культуре *D. salina*, необходимо осуществлять обмен среды около 30 % от объёма.

1. Боровков А. Б. Динамика пигментов и роста микроводорослей в хемостате на примере *Dunaliella salina* Teod.: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Севастополь, 2008. – 31 с.
2. Лелеков А. С. Моделирование роста и биосинтеза морских микроводорослей в квазинепрерывной культуре.: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Севастополь, 2009. – 26 с.
3. Масюк Н. П. Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода *Dunaliella* Teod. – К. : Наук. думка, 1973. – 487 с.

4. Тренкеніу Р. П., Белянин В. Н. Влияние элементов минерального питания на продуктивность водоросли *Platymonas viridis* Rouch. // Биология моря. – 1979. – **51**. – С. 41 – 46.
5. Тренкеніу Р. П. Простейшие модели роста микроводорослей 1. Периодическая культура // Экология моря. – 2005. – Вып. **67**. – С. 89 – 97.
6. 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 / San-Pietro. – New York: Plenum Publ. Corp., 1982. – P. 207 – 214.
7. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**. – P. 265 – 275.
8. Wettstein D. Chlorophyll-letale und der submikroskopische Formwechsel der Plastiden // Experimental Cell Research. – 1957. – **12**, No 3. – P. 427 – 506.
9. Vasquez-Suarez A., Guevara M., Salazar G. et al. Growth and biochemical composition of four *Dunaliella* strains to be used in aquaculture. // Bol. Cent. Invest. Biol. (Maracaibo). – 2007. – **41**, No 2. – P. 181 – 194.

Институт биологии южных морей НАН Украины,  
г. Севастополь, Украина

Получено 28.04.2010 г.

О. С. ЛЕЛЕКОВ, І. М. ГУДВІЛОВИЧ

**ПРОДУКЦІЙНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ РОСТУ ТА БІОСИНТЕЗУ  
КВАЗІБЕЗПЕРЕРВНОЇ КУЛЬТУРИ ЗЕЛЕНОЇ МІКРОВОДОРОСТІ *DUNALIELLA SALINA* TEOD.**

**Резюме**

Досліджено динаміку щільності, вмісту хлорофілу *a* і білка квазібезперервної культури *Dunaliella salina*. На етапі періодичної культури розраховано продукційні характеристики дуналієли з біомаси, хлорофілу *a* і білку, за допомогою яких побудовано прогностичні криві відносного вмісту хлорофілу *a* і білка. Показано, що для отримання максимальної продуктивності по біомасі, білку і фотосинтетичним пігментам в квазібезперервної культури *D. salina*, необхідно здійснювати обмін середовища близько 30 % від об'єму.

**Ключові слова:** *Dunaliella salina*, продуктивність, математична модель, хлорофіл, білок.

A. S. LELEKOV, I. N. GUDVILOVICH

**PRODUCTION CHARACTERISTICS OF SEMICONTINUOUS CULTURE OF  
GREEN ALGAE *DUNALIELLA SALINA* TEOD. GROWTH AND BIOSYNTHESIS**

**Summary**

The dynamics of cell density, chlorophyll *a* and protein content of semicontinuous culture of *Dunaliella salina* were investigated. At the stage of batch culture production characteristics *D. salina* on biomass, chlorophyll *a* and protein were estimated. Characteristics were used to construct prognostic curves of the relative content of chlorophyll *a* and protein. It is shown that to maximize the productivity of the biomass, protein and photosynthetic pigments in semicontinuous culture *D. salina*, it is necessary to adjust medium dilution rate at about 30 %.

**Key words:** *Dunaliella salina*, productivity, mathematical model, chlorophyll, protein.