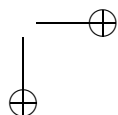
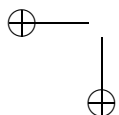


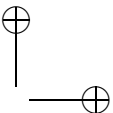
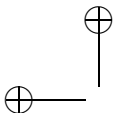
БИБЛИОТЕКА БИОТЕХНОЛОГА

**Р. П. Тренкеншу, Р. Г. Геворгиз,
А. Б. Боровков**

**ОСНОВЫ ПРОМЫШЛЕННОГО
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
ДУНАЛИЕЛЛЫ СОЛОНОВОДНОЙ
(*DUNALIELLA SALINA* TEOD.)**

**Севастополь,
2005**





УДК 639.64

Тренкеншу Р. П., Геворгиз Р. Г., Боровков А. Б.

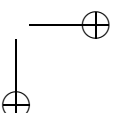
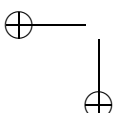
Основы промышленного культивирования Дуналиеллы соленоводной (*Dunaliella salina* Teod.) — Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2005. — 103 с.

В монографии представлены результаты исследований продукционных характеристик *Dunaliella salina* Teod., проведённых в производственных условиях. Уделено внимание вопросам оптимизации процесса культивирования, биологии и биохимии зелёной микроводоросли *D. salina*.

Монография представляет интерес для специалистов-биотехнологов. Также будет полезна аспирантам соответствующих специальностей и студентов высших учебных заведений.

© Авторский текст — Тренкеншу Р. П., Геворгиз Р. Г.,
Боровков А. Б., 2005

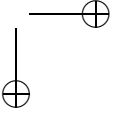
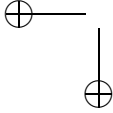
© Оформление и макет — Геворгиз Р. Г., 2005





Введение

Галобные морские микроводоросли — продуценты целого ряда биологически активных соединений, которые находят своё применение в различных сферах человеческой деятельности: медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве и пр. Одним из наиболее ценных биологически активных соединений является β -каротин, относительное содержание которого наиболее высоко в зелёной галобной микроводоросли *Dunaliella salina* Teod. Галобные микроводоросли также выступают в роли стартовых кормов при разведении моллюсков и молоди рыб и являются незаменимым компонентом при составлении различного рода сухих кормов и пищевых добавок, имеющих широкий спектр применимости в птицеводстве и животноводстве. Тенденция постоянно возрастающего объёма потребления ценных веществ природного происхождения способствует разработке высокопродуктивных технологий культивирования микроводорослей в искусственных условиях. Тысячи публикаций, как в отечественной литературе, так и в зарубежной, указывают на огромный опыт и глубину знаний учёных, занимающихся данной проблематикой. Несмотря на значительные успехи



в разработке технологий выращивания и использования биомассы микроводорослей в лаборатории, разработки технологий для промышленных масштабов представлены достаточно скромно. Отчасти это связано с тем, что результаты любых исследований на производстве, разработка технологических приёмов и пр., как правило, являются собственностью владельца производства и не представлены в открытой печати.

Немаловажной научной проблемой являются вопросы математического моделирования как всего технологического процесса, так и отдельных его этапов. К примеру, разработка сложных параметрических моделей с большим количеством переменных становится мало пригодной в условиях сельскохозяйственного производства, поскольку при организации производства управление всеми параметрами становится невозможным. Поэтому в данном случае предпочтительно использование простейших моделей, которые естественным образом учитывают и биологическую составляющую. Иными словами, необходимо решить непростую задачу описания простейшими моделями такого сложного процесса как рост микроводорослей.

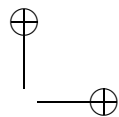
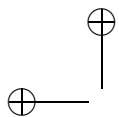
Переход от лабораторной технологии к полупромышленной и промышленной неизбежно сопровождается так называемым «эффектом масштабирования», вследствие чего на производстве приходится решать совсем иные задачи, нежели в лаборатории. Порой суть дела ясна, однако реализация на уровне производства требует дополнительных решений сложных технических

задач. Сверх того, решение проблемы в значительной степени может усложнить экономическая сторона дела.

Чтобы снизить себестоимость продукта, разработка технологии изначально должна быть направлена по пути использования дешёвых материалов и источников энергии, например, солнечного света. Кроме того, по возможности, необходимо избегать использования дорогостоящего специального оборудования.

Существенной частью работы по организации производства и выпуска продукции является создание всей сопроводительной документации, утверждённой соответствующими инстанциями. Для производства этот этап, в некотором смысле, самый главный, поскольку в условиях рынка любой производитель нуждается в разрешительной документации для реализации своего продукта. Нетрадиционность объекта, отсутствие сертифицирующей документации по данному объекту, естественно, усложняет ситуацию. Например, на Украине до сих пор нет общепринятого документа (паспорта), подобного [6] на виды микроводорослей, в том числе и на *D. salina*.

Таким образом, разработка и внедрение технологий выращивания микроводорослей в промышленность требует решения целого комплекса научно-организационных задач. Для этого необходимо привлечение специалистов различных профилей: математиков, биологов, менеджеров и т. д.



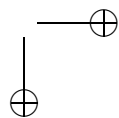
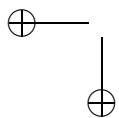
ГЛАВА 1

Dunaliella salina Teod. как объект биотехнологии

1.1. Зелёная микроводоросль *Dunaliella salina*

История обнаружения и краткая характеристика. «Красное цветение» гипергалинных водоёмов обнаружили очень давно (1836 г.), однако о причинах его возникновения ученые спорили почти 100 лет. И лишь Дюналь [14] первый связал это явление с развитием микроскопических водорослей, которые впоследствии стали объектом изучения широкого круга специалистов.

Наибольшую известность среди ботаников и специалистов-практиков получил род *Dunaliella* семейства *Dunaliellaceae*, впервые описанный в 1905 г. Род водоросли был назван в честь Дюналя, который впервые дал правильное объяснение «красного цветения» морской воды. История изучения водоросли подробно изложена в [14].



Род включает 29 солоноводных, морских, пресноводных и почвенных видов; 6 из них найдены на территории Украины исключительно в солёных водоёмах. Хорошо известна *D. salina* — дуналиелла солоноводная, развивающаяся в гипергалинных водоёмах степного Крыма. В массовом количестве она вызывает «красное цветение», особенно яркое в период летнего испарения воды из мелководных лагун, когда на поверхности таких лагун образуются кристаллы соли.

Краткая характеристика. Клетки водоросли разнообразной формы — овальные, эллипсоидные, яйцевидные, грушевидные, иногда шаровидные, цилиндрические или веретеновидные; радиально- или билатерально симметричные, редко дорсовентральные или слегка ассиметричные [14]. Размеры клеток разнообразны: их длина может колебаться от 2,8 до 40 мк, ширина от 1,5 до 20 мк, объём от 8 до 4500 мк³. Наиболее подробные иллюстрации по изменчивости дуналиелл имеются в работе [14], где представлены материалы по гомологическим рядам модификационной изменчивости видов дуналиелл. Это важно учитывать для контроля чистоты культуры, поскольку при выращивании клетки *Dunaliella salina*, окружённые лишь плазмолеммой, склонны к метаболии, проявление которой наиболее сильно выражено при технологическом процессе, когда водоросли подвергаются различным воздействиям (например, перемешиванию, сепарированию, осаждению, фильтрации и пр.).

Важную дополнительную информацию при иденти-

фикации организма имеет хлоропласт, который по цвету чаще всего зелёный, иногда жёлтый, бурый до красного. В эксперименте способность изменять цвет проявляется как реакция на неблагоприятные условия. По форме хлоропласт обычно чашевидного типа с пиреноидом и глазком, реже — без них. Пульсирующие вакуоли (одна или две) встречаются только у пресноводных видов. По обе стороны от папиллы, на выпуклом апикальном конце клетки прикреплены два жгутика. Обычно жгутики одинаковой длины, равной или превышающей длину клетки. У молодых, только что разделившихся клеток один из жгутиков может быть короче другого.

Клетки *D. salina* изоконтны и характеризуются веслоподобным движением жгутиков. Как и вся клетка, жгутики покрыты протоплазматической мембраной. Их тонкая структура характеризуется обычной конструкцией: 9 фибрилл располагаются по периметру и 2 — по центру.

Для *D. salina* характерны вегетативный, бесполой и половой типы размножения. Первый является преобладающим, происходит преимущественно в темноте путём поперечного деления клеток. Последовательность деления органелл строго не детерминирована и легко нарушается, особенно в старых культурах. При этом образуются уродливые формы [14].

В неблагоприятных условиях *D. salina* способна образовывать цисты бесполого происхождения. Цисты имеют шаровидную форму, толстую двойную оболочку и гранулированное содержимое, освобождение которого

при прорастании происходит через щель в оболочке. Перед прорастанием цисты её содержимое красного цвета зеленеет и делится с образованием 2–4 клеток.

Половой процесс у *D. salina* — гологамного типа. Копуляция может происходить как на свету, так и в темноте. В результате слияния двух клеток образуется неподвижная зигота, покрытая оболочкой (иногда слоистой). Перед прорастанием происходит редукционное деление с образованием 2–32-х клеток. Количество клеток обусловлено размерами зиготы и условиями, в которых она развивается.

Географическое распространение. *D. salina* отмечена в Европе (Средиземноморье, побережье Чёрного, Азовского и Каспийского морей), Азии (степная зона Западной Сибири, Казахстан, Средняя Азия, Индия, Ява), Северной Америке (штаты Калифорния, Невада, Юта), Южной Америке (Чили), северной Африке (Алжир, пустыня Сахара) и Южной Австралии. В наиболее северных, менее характерных для данного вида местонахождениях (окрестности Иновроцлава (Польша), оз. Карачинское (Новосибирская обл.), обнаружены морфологически отклоняющиеся от типа популяции. На территории всего Земного шара этот вид представлен в аридных зонах (пустыни, степь, реже — лесостепь), т. е. в условиях, способствующих образованию водоёмов с высокой степенью минерализации воды. Гипергалинные водоёмы, населённые *D. salina*, размещены не только во внутриконтинентальных, аридных

или субаридных областях, но чаще всего — на побережьях морей и океанов. Таким образом, *D. salina*, отмеченная на пяти континентах, имеет мультирегиональный тип ареала.

Экологическая толерантность. Общей особенностью всех солёных водоёмов является нестабильный солевой режим, на основании чего их относят к пойкилогалинным водоёмам, в отличие от морских и пресных — гомойогалинных. Нестабильный солевой режим солёных водоёмов является основным контролирующим фактором развития в них альгофлоры. Поэтому водоросли представлены здесь немногочисленными видами, способными выдерживать резкие перепады и широкие границы солёности.

Исследование эколого-физиологических, биохимических и цитологических особенностей гипергалобных видов *Dunaliella* позволили выявить механизмы солеустойчивости. Феноменальная стойкость *D. salina* к резким осмотическим сдвигам не является результатом изоляции клеток от внешней среды и поддержания в них гомеостатических условий. Наоборот, эта устойчивость является результатом легкой проницаемости ряда плазматических мембран для воды и некоторых ионов, вследствие чего происходит быстрое уравновешивание внешнего и внутреннего осмотического давления. Эти процессы, в свою очередь, сопровождаются резкими перепадами концентрации клеточного сока, что вызывает новые проблемы приспособления внут-

рикеточных структур, фотосинтетического аппарата и белков плазмы к этим условиям. Данные многих авторов свидетельствуют о том, что с увеличением солёности окружающей среды в клетках *Dunaliella* происходит перестройка пигментного аппарата, дыхательного и фотосинтетического метаболизма, нуклеинового обмена, смена активности терминальных оксидаз, обеспечивающие выживание этих водорослей в экстремальных условиях [13].

Согласно экспериментальным данным, амплитуда солёности, которую выдерживает *D. salina*, находится в пределах 30–300 г/л [14, 17], по мнению других авторов — 2,5–500 г/л [41].

Таким образом, экспериментальные данные подтверждают наблюдения в естественных условиях, свидетельствуя об эвригалобном характере этих видов и опровергая взгляд на них как на стеногалобные, облигатно гипергалобные организмы.

Резкое изменение осмотического давления при внезапном разбавлении концентрированной среды приводит к разрушению и гибели клеток *Dunaliella*. Однако А. П. Артари (цит. по [14]) установил, что *D. salina* может выдерживать внезапное изменение концентрации питательного раствора на 6, 12, 15 и даже 18% в сторону уменьшения и на 6–12% в сторону увеличения. Благодаря своей выдающейся солеустойчивости гипергалобные виды *Dunaliella* являются исключительно удобными модельными объектами для изучения механизма галофилии.

Массовое развитие *Dunaliella* в естественных бассейнах чаще всего лимитируется недостатком биогенных элементов: азота и фосфора [14, 42]. Эти элементы влияют на характер метаболизма, состав пигментов, активность фотосинтетических процессов, рост и развитие *Dunaliella* [14, 23].

Как известно, зелёные водоросли способны усваивать азот органических и неорганических соединений. Основными источниками минерального азота являются нитраты, нитриты и соли аммония. Способность водорослей к утилизации различных форм азота в значительной степени зависит от активной реакции окружающей среды.

По данным А. П. Артари и Е. С. Милько наиболее благоприятным источником азота для роста *D. salina* является азотнокислый натрий. Оптимальная для роста этих водорослей концентрация NaNO_3 0,5–1 г/л, однако скорость их размножения почти не зависит от концентрации NaNO_3 в пределах 0,25–20 г/л [17]. Виды *Dunaliella* хорошо выдерживают насыщенные растворы нитратов. Широкий ростовой оптимум концентрации различных ингредиентов питательного раствора, особенно стойкость к высоким дозам азота, является большим преимуществом *Dunaliella* как объектов массового культивирования.

Источником фосфора для видов *Dunaliella*, как и для большинства других зелёных водорослей, служат фосфаты. Из них наиболее благоприятным для роста оказался калий фосфорнокислый двузамещённый, так

как большинство видов *Dunaliella* предпочитает щелочную реакцию среды [17, 43]. Ростовой оптимум концентрации фосфатов для *D. salina* находится в пределах, известных для других водорослей (0,02–0,25 г/л K_2HPO_4) [17, 44]. Рост видов *Dunaliella* наблюдался в широких концентрационных пределах 0,004–5 г/л K_2HPO_4 , хотя доза 5 г/л угнетала рост водорослей [17].

Сера принадлежит к элементам, входящим в состав всех живых организмов. Минимальные дозы сульфата магния, необходимые для нормального развития видов *Dunaliella*, находятся в пределах до 2 г/л [12, 35, 43]. В естественных эвгалинных и гипергалинных водоёмах сернокислый ион имеется в достаточном количестве, обеспечивающем нормальный рост и размножение клеток *Dunaliella*. Концентрация калия и магния в воде эвгалинных и гипергалинных водоёмов намного превышает минимальные потребности водорослей [41]. Литературные данные относительно потребности водорослей в кальции довольно противоречивы. Хлористый кальций в концентрации 0,02–2 г/л стимулирует рост культуры *D. salina* на питательной среде Артари, ускоряя темп деления клеток [14]. Однако большинство исследователей считает, что следовых концентраций кальция вполне достаточно.

Потребность в Na^+ у видов *Dunaliella* оказалась специфической, так как другие одновалентные ионы не могут заменить натрий в питательной среде [47]. Специфическая потребность в натрии, по-видимому, явля-

ется общим феноменом для обитателей эв- и гипергалинных вод. У видов *Dunaliella* минимальная потребность в натрии значительно выше, чем в других элементах морской воды [44].

Хлор является основным галогеном в составе большинства, если не всех, водорослей. Галобионтный вид *D. salina* не может расти без Cl [12]. А. П. Артари также заметил, что «в крепких растворах $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ рост *D. salina* лучше в том случае, когда защитную роль выполняет NaCl, а не $Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$, т. е. тогда, когда анионы разные» [14]. Оптимум соотношения Cl/SO₄ для роста *D. salina* составляет 3,2, а оптимум для накопления каротина — 8,6 [12].

Микроэлементы являются одним из решающих факторов распространения водорослей в природе. Считают, что изготовление карт распределения ростовых веществ и микроэлементов в водоёмах с учётом их сезонной периодичности позволит установить закономерности в распространении и сроках возникновения «цветения» воды [44]. Существует многочисленная литература, в которой проблема микроэлементов в жизни водорослей освещается с разных точек зрения. Однако данные, касающиеся непосредственно представителей рода *Dunaliella*, очень скудны.

Спектральный анализ солей Сакского и Сасык-Сивашского солепромыслов в Крыму [14] показал, что марганец и медь в этих образцах представлены в следовых количествах, а цинк, бор, кобальт и молибден отсутствуют. Обогащение естественной рапы из Сак-

ских водоёмов раствором микроэлементов по Гютнеру в опытах увеличивало урожай двухнедельной культуры *D. salina* в два раза. Искусственные питательные среды, рекомендованные для выращивания *Dunaliella*, содержат более или менее разнообразный набор микроэлементов [5, 35, 42, 43], однако эти рекомендации в большинстве случаев не базируются на точном эксперименте.

Согласно В. В. Упитису [34] существуют микроэлементы с широкой (Mn, Mo, Co, Cr, Fe, B) и узкой (Cu, Zn, Ni, Ti, V, W) амплитудой оптимума концентрации в среде. Кроме теоретических выкладок в работе [34] приводятся и конкретные экспериментальные данные. Эксперименты Р. П. Тренкеншу и В. Н. Белянина [29] показывают, что при отсутствии лимитирования по макроэлементам развитие культуры определяется соотношением микроэлементов.

Жизнедеятельность каждого организма возможна в определённых пределах концентрации H^+ и OH^- -ионов. Кроме непосредственного влияния на жизнеспособность, скорость вегетативного деления или спорообразование водорослей рН играет опосредованную регуляторную роль в их питании, определяя количество доступного железа в среде, соотношение различных форм азотного и углеродного, автотрофного и гетеротрофного питания.

Минерализованные эв- и гипергалинные воды благодаря наличию карбонатно-бикарбонатной системы характеризуются устойчивыми буферными свойствами и

нейтрально-щелочной активной реакцией. При этом суточные и сезонные колебания рН очень незначительны. Поэтому большинство представителей рода *Dunaliella*, обитая в гипер- и эвгалинных водоёмах, являются стеноионными организмами, предпочитающими нейтрально-щелочную реакцию среды и не выдерживающими резких изменений.

Типичный гипергалоб *D. salina* в естественных условиях встречается в диапазоне рН 6,5–9,5 [12]. Согласно [17], рост *D. salina* не зависит от рН равного 7–9. По данным [16] этот вид сохраняет жизнедеятельность при рН 6–10,5, по данным Милько — при рН 5,5–10. Однако исследования [35] свидетельствуют, что при рН 10,8 *D. salina* ещё продолжает фотосинтезировать. Ростовый оптимум рН для этого вида 8–9 [16].

Минерализованные водоёмы характеризуются своеобразным температурным режимом. Летом температура рапы достигает 80°C, зимой, благодаря высокой концентрации солей, снижающих точку её замерзания, охлаждается до 30–32°C ниже нуля.

Амплитуда сезонных температурных колебаний солёных водоёмов может достигать 110°C и более. Амплитуда суточных температур также достаточно велика. Поэтому виды *Dunaliella*, обитающие в этих водоёмах, характеризуются исключительной термотолерантностью и могут служить прекрасными модельными объектами для исследования механизмов морозоустойчивости, жароустойчивости и стойкости к резким температурным сдвигам.

Таким образом, гипергалобные виды *Dunaliella* характеризуются более высокой жароустойчивостью по сравнению с большинством других зелёных водорослей, приближаясь в этом отношении к некоторым термофильным организмам. Как известно, высокий температурный максимум является ценным свойством водорослей — объектов массового культивирования, в частности потому, что термофильные организмы обладают более высокой потенциальной продуктивностью по сравнению с мезофильными [3].

Характеризуясь значительной теневыносливостью, виды *Dunaliella* вместе с тем являются гелиофильными организмами [12]. Так, в условиях Сакского и Сасык-Сивашского водоёмов при 65 клк красные клетки *D. salina* скапливаются в поверхностном слое рапы, образуя плёнку [12]. Аналогичная картина наблюдалась и при более высокой освещённости порядка 100 клк и выше.

Таким образом, *Dunaliella salina* выдерживает широкую амплитуду экстремальных значений различных факторов внешней среды (общей солёности, содержания и соотношения отдельных осмотически действующих и биогенных элементов, температуры, освещённости). Следует подчеркнуть, что оптимальные для этих водорослей значения некоторых параметров (например, освещённости, температуры) близки к тем, которые известны для других Chlorophyta, однако по своей устойчивости к их крайним, экстремальным значениям виды *Dunaliella* намного их превосходят. Кроме того, пред-

ставители этого рода характеризуются исключительной устойчивостью к резким и глубоким изменениям абсолютных значений факторов.

Пределы устойчивости, обнаруженные в экспериментальных условиях, как правило, хорошо согласуются с экологической толерантностью *D. salina*, наблюдаемой в природе. Однако в отдельных случаях экспериментальные границы устойчивости к крайним значениям некоторых факторов среды оказались более широкими по сравнению с наблюдаемыми в естественных условиях.

Пигментный состав. Согласно [15], анализ пигментного состава *Dunaliella* на примере 12 штаммов показал, что на долю хлорофилла *a* приходится 50–59%, а на долю хлорофилла *b* — 19–25% суммы присутствующих в клетке пигментов. Ещё меньше доля каротиноидов. На их долю приходится 8–16% всех пигментов. Соотношения содержания различных пигментов у дуналиеллы находятся в следующих пределах:

Наименование	% АСВ
Хлорофиллы/каротиноиды	— 2,8–4,4
Ксантофиллы/каротин	— 1,3–4,2
Хлорофилл <i>a</i> /хлорофилл <i>b</i>	— 2,1–3,0

В целом эти показатели соответствуют пигментным соотношениям других зелёных водорослей, хотя степень

изученности пигментного состава представителей разных отделов отличается. У наиболее распространённых водорослей идентифицированы все изомеры каротина ($\alpha, \beta, \gamma, \varepsilon$), а также представлен более широкий набор ксантофиллов (зеаксантин, неоксантин, виолаксантин, микронон, сифоноксантин, сифонеин, астаксантин, ликопин). При этом следует отметить, что отдельные показатели соотношения пигментов отличаются даже для различных штаммов. При этом абсолютное содержание пигментов и их суммы коррелирует со средними объемами клеток, а степень вариабельности — с экологическими особенностями видов.

По сравнению с другими морскими водорослями, дуналиеллы характеризуются более низкими соотношениями хлорофиллы/каротиноиды и ксантофиллы/каротиноиды. К сказанному следует добавить, что в отличие от пигментных характеристик, другие биохимические показатели дуналиелл в благоприятных условиях нахождения вида между собой не отличаются. Это свидетельствует об определенной пластичности пигментного комплекса водоросли в зависимости от условий её выращивания.

Влияние различных факторов на образование каротина. Имеющиеся материалы свидетельствуют [19–21] о том, что величина содержания каротина в технологическом процессе изменяется в зависимости от способа её расчёта. Содержание β -каротина выражают в мг/мл суспензии, в мг/клетку, в процентах на сухое вещество.

Во всех случаях получаются разноплановые данные (см. табл. 1.1).

Таблица 1.1: Количественные показатели содержания β -каротина в пересчёте на различные единицы [19].

Концентрация соли	Концентрация β -каротина
2 М	$3,0 \times 10^{-9}$ мг/кл
	$3,1 \times 10^{-3}$ мг/мл
3 М	$4,8 \times 10^{-9}$ мг/кл
	$2,9 \times 10^{-3}$ мг/мл
4 М	$12,6 \times 10^{-9}$ мг/кл
	$5,3 \times 10^{-3}$ мг/мл
5 М	$14,0 \times 10^{-9}$ мг/кл
	$3,6 \times 10^{-3}$ мг/мл

Как видно из представленных данных в зависимости от особенностей расчёта концентрация β -каротина различается в 1,5–3 раза. Это в значительной мере затрудняет точную оценку продуктивности и получение прогнозируемых цифр выхода β -каротина. Поэтому при промышленном культивировании одноклеточных водорослей с целью осуществления биологического синтеза ценных химических соединений на их основе важнейшую роль играет параметрическое управление процессами жизнедеятельности продуцентов.

Принцип управления биохимическим составом ба-

зируется не только на создании оптимальных условий культивирования, но и на различных способах разобщения (в основном, химического) клеточных функций деления и фотосинтеза. Таким разобщением вызывается явление биохимической адаптации фотосинтезирующих клеток к осуществлению определенного пути биосинтеза заданного продукта.

Физиологической основой этого метода является различная чувствительность (устойчивость) к экстремальным воздействиям функции хлоропласта и процессов, связанных с прохождением митотического цикла, развитием и делением клеток [11, 24, 27]. Благодаря этому при определённых сочетаниях напряжённости физико-химических факторов внешней среды (температура, свет, минеральное питание и др.) имеет место блокирование деления клеток при сохранении фотосинтеза. Это приводит к переключению альтернативных путей преобразования продуктов восстановления углерода в сторону накопления запасных веществ (триглицеридов, полисахаридов), природа которых обусловлена генетическими свойствами штамма [9, 11, 24].

Показано также, что переориентация биосинтеза фототрофных клеток водорослей сопровождается сложной цепью внутриклеточных событий и регуляторных актов [27], связанных с активацией протеолитических ферментов [24] на начальных этапах перестройки биосинтеза, с индукцией и синтезом *de novo* белков, необходимых для конденсации продуктов фотосинтеза в запасные вещества.

В связи с этим особый интерес представляют полученные лабораторные данные по параметрическому управлению биосинтезом β -каротина в клетках *D. salina* в условиях интенсивной культуры [1]. Авторами исследована зависимость накопления β -каротина в клетках и его валового выхода от концентрации хлористого натрия, интенсивности света, температуры, при исключении из среды азота или магния. Показана высокая эффективность сочетания факторов «субоптимальная температура + высокая интенсивность света» в отношении скорости накопления в клетках и валового выхода β -каротина, что может быть использовано для параметрического управления биосинтезом этого соединения в условиях интенсивной культуры дуналиеллы.

Исследование биологии *D. salina* и экологических факторов, вызывающих её переход к активному накоплению β -каротина в естественных условиях, показало, что биосинтез этого соединения является приспособительной реакцией организмов в ответ на экстремальные условия среды. К ним относят изменения солёности, минерального состава среды, температуры и освещённости, а также сочетания комплекса указанных параметров.

Одним из факторов, влияющих на накопление β -каротина в клетках дуналиеллы в естественных условиях, является изменение концентрации хлористого натрия в водоёмах, в особенности при испарении воды в летне-осенний период. Оптимальной концентрацией хлористого натрия в среде для роста и развития дуналиеллы в

культуре является 2 М [1, 14]. Увеличение концентрации хлористого натрия приводит к изменению пигментообразования и повышению содержания β -каротина в интенсивной культуре. Типичная реакция на изменение солёности проявляется и при уменьшении концентрации хлористого натрия. При этом обращает на себя внимание обратная корреляция между накоплением β -каротина в клетках и скоростью роста культуры. Это указывает на то, что влияние хлористого натрия на биосинтез β -каротина не является специфическим, и, очевидно, связано с нарушением развития и размножения клеток опосредовано.

Как свидетельствуют данные [19], повышение содержания хлористого натрия в питательной среде от 2 до 5 М замедляет деление клеток и изменяет соотношение пигментов. При этом количество хлорофилла уменьшается, каротинов — увеличивается, интенсивность фотосинтеза падает, интенсивность дыхания при повышении содержания соли от 2 до 4 М не изменяется, а от 4 до 5 М падает.

Влияние азотного голодания на накопление β -каротина. Исключение азота из питательной среды изменяет направленность биосинтеза водорослей (например, у хлореллы), вызывая усиленный синтез запасных веществ углеводной или липидной природы. Недостаток азота приводит также к увеличению содержания β -каротина в клетках *D. salina* в условиях экстенсивной культуры более чем в 2 раза [18].

Исключение азота из среды в условиях интенсивной культуры также приводит к увеличению содержания β -каротина в клетках дуналиеллы почти в 3 раза по сравнению с контрольным вариантом. При этом увеличение освещённости вызывает дополнительное повышение содержания β -каротина. Однако суммарное количество β -каротина в единице объёма суспензии (валовый выход продукта) оказывается одинаковым как в контрольном, так и в опытном вариантах, что обусловлено большой скоростью роста в условиях интенсивной культуры (увеличение численности клеток) *D. salina* на стандартной питательной среде. При этом в одном случае суммарный выход β -каротина обусловлен повышением (до 10%) относительного содержания (на клетку), во втором — достаточно большой скоростью увеличения численности клеток, но без заметного повышения содержания β -каротина (до 2%).

Таким образом, изменение состава питательной среды и условий минерального питания (повышение концентрации хлористого натрия, исключение азота и магния из среды) приводит к существенному повышению содержания β -каротина в клетках дуналиеллы солоноводной. Однако такой способ управления биосинтезом β -каротина, очевидно, приемлемый для экстенсивной культуры *D. salina*, оказывается недостаточно эффективным из-за малой скорости процесса для параметрического управления биосинтезом β -каротина у этих организмов в условиях интенсивной культуры. Но при организации двухфазного процесса культивирования ду-

налиеллы, когда на первом этапе осуществляют наращивание «зелёной» массы водоросли, а на втором — индуцирование синтеза и накопления β -каротина, мероприятия по изменению условий минерального питания остаются актуальными.

Зависимость биосинтеза β -каротина от интенсивности света и температуры. Свет является ведущим экологическим фактором в отношении накопления β -каротина в клетках дуналиеллы [14, 18]. Повышение облучённости в области интенсивностей света, превышающих насыщение световых кривых роста культуры *D. salina* (2 кВт/м^2 и более), вызывает существенное увеличение содержания β -каротина. При этом максимальные величины суточного прироста β -каротина в клетках наблюдаются при субоптимальных температурах и составляют при 22°C и облучённости $0,37 \text{ кВт/м}^2$ более $220 \text{ мкг}/10^9$ клеток в сутки при плотности культуры 15 млн/мл и толщине слоя суспензии 3 см . Уменьшение толщины слоя суспензии до 1 см способствует дальнейшему увеличению скорости синтеза β -каротина, прирост которого возрастает до $1370 \text{ мкг}/10^9$ клеток в сутки даже при плотности культуры $55 \text{ млн. клеток/мл}$. При этом валовый выход β -каротина с единицы объёма суспензии в сутки превышает почти в 3 раза его выход при оптимальных для роста культуры условиях и составляет около 90 мг/л культуры в сутки.

На жизнедеятельность клеток дуналиеллы существенное влияние оказывает спектральный состав све-

та. Исследование влияния УФ излучения на параметры фотодвижения двух видов дуналиелл (*D. salina*, *D. viridis*) показало, что в отличие от фототопотаксиса и относительной подвижности клеток скорость поступательного движения клеток обоих видов не зависит от интенсивности, длины волны УФ излучения и продолжительности облучения [22]. Этот факт свидетельствует о различиях в механизмах, управляющих параметрами движения (с одной стороны, скоростью поступательного движения, с другой — фототопотаксиса и относительной подвижностью клеток) на клеточном уровне. Впервые обнаружено преобразование положительного фототопотаксиса обоих видов водорослей в отрицательный под воздействием ультрафиолетового облучения с последующим ингибированием фототопотаксиса при увеличении продолжительности облучения.

Наиболее сильное ингибирующее действие на фототопотаксис оказывает ультрафиолетовое излучение в области 248–334 нм, где, возможно, находятся максимумы спектров поглощения белков, связанных с двигательным аппаратом и с фоторецепторной системой водорослей. Важно отметить, что влияние УФ излучения на фотодвижение исследованных видов *Dunaliella* имело обратимый характер: фотоориентация клеток восстанавливалась до контрольных значений на всех исследуемых длинах волн (кроме 248 нм) через 2 ч после прекращения облучения интенсивностью 2 Вт/м².

По данным [22], зависимость фототопотаксиса и подвижности клеток водорослей от интенсивности дли-

ны волны УФ излучения и продолжительности облучения свидетельствует о возможности использования этих водорослей в качестве биотестов уровня и характера природного ультрафиолетового излучения. Отмеченный момент, на наш взгляд, следует иметь в виду при установке фотобиореакторов на солнечном свете в условиях степного Крыма, чтобы в периоды доминирования соответствующего УФ облучения защищать клетки (экранированием света) от ингибирующего излучения.

В пользу сказанного свидетельствуют и данные А. И. Божкова, В. П. Комаристой [4], показавших, что при стандартных условиях культивирования (освещённость 6,5 клк, температура 25–27°C) в процессе культивирования 2 видов дуналиелл с 4-х по 24-е сутки роста (при исходной концентрации клеток 1,3 млн/мл) в клетках *D. salina* содержалось в 1,5–2 раза больше β -каротина и нейтральных липидов (неэтерифицированные жирные кислоты, триацилглицериды, стероиды), чем в клетках *D. viridis*. По мнению авторов, в процессе культивирования водорослей в накопительном режиме содержание каротиноидов может изменяться ритмически или же оставаться на постоянном уровне, а характер этих изменений определяется исходным уровнем содержания каротиноидов в клетках. При этом комплексное изменение условий культивирования (увеличение температуры до 38–40°C, освещённости до 8 клк, исходной концентрации клеток до 5–10 млн/мл) сопровождается увеличением содержания β -каротина в клетках водорослей в 2–3 раза. Однако различия между

исследованными видами по этим показателям не были обнаружены, в отличие от стандартных условий культивирования. Следовательно, комплексное влияние таких факторов, как исходная концентрация клеток, температура и освещённость, индуцируют липо- и каротиногенез. При этом содержание липидов и каротиноидов у обоих видов водорослей увеличивается в 2–4 раза. Это даёт основание авторам говорить о том, что *D. viridis* при определённых условиях культивирования также может быть перспективным продуцентом каротиноидов и липидов.

Таким образом, индуцирующее действие субоптимальных температур на фоне высоких освещённостей является фактором, который может быть эффективно использован для параметрического управления биосинтезом β -каротина в условиях интенсивной культуры дуналиеллы с применением техники проточного двухфазного культивирования [11] этих водорослей.

Водоросль *Dunaliella salina* — уникальный организм, способный выдержать широкую амплитуду экстремальных значений различных абиотических факторов (общей солёности, содержания и соотношения отдельных осмотически действующих и биогенных элементов, температуры, освещённости). В связи с вышперечисленным данный вид микроводорослей является прекрасным модельным объектом для исследования механизмов устойчивости к действию различного рода факторов. Большой интерес к объекту исследования объясняется также способностью водоросли синте-

зировать и запасать большое количество β -каротина — пигмента группы каротиноидов, который, как известно, является источником образования витамина А. В промышленных условиях при управляемом биосинтезе β -каротина *D. salina* при использовании принципа разобщения клеточных функций деления и фотосинтеза можно получить большие объёмы продукта в рамках небольших интервалов времени.

1.2. Особенности интенсивного культивирования *Dunaliella salina*

Питательные среды. *Dunaliella salina* хорошо развивается на 3-х питательных средах: основная питательная смесь (ОПС) [14], среда Артари и её модификации [1, 14]. Для приготовления этих сред используют пресную воду. При использовании морской воды основную роль играют: солёность, наличие необходимых минеральных элементов и отсутствие токсических компонентов. Наиболее проста по составу среда ОПС:

Компонент	г/л
NaCl	— 116,0
MgSO ₄ × 7H ₂ O	— 50,0
KNO ₃	— 2,5
K ₂ HPO ₄	— 0,2

Она поддерживает рост гипергалобных видов *Dunaliella* в течение нескольких месяцев и включает всего 4 вышеперечисленных компонента. Удельный вес среды — 1,1; рН 6–7 (регулируют его с помощью концентрированной щёлочи). В состав этой среды входят все необходимые для роста водоросли биогенные элементы. Углерод поглощается из воздуха в виде CO_2 , но может подаваться и дополнительно при интенсификации роста культуры. Микроэлементы поступают в виде примесей, имеющих даже в химически чистых солях, а также с водопроводной водой. Хлористый натрий и сернокислый магний несут в среде двойную нагрузку, являясь одновременно источниками биогенных элементов и осмотически действующими агентами. Наличие последних играет чрезвычайно важную роль в процессах роста, развития гипергалобной водоросли и синтезе ею β -каротина. В связи с этим осмотичность питательных сред в процессе культивирования должна тщательно контролироваться и поддерживаться на оптимальном уровне.

Питательную среду того же состава, что и ОПС, но менее концентрированную, Н. П. Масюк использовала для выращивания других морских видов *Dunaliella*:

Компонент	г/л
NaCl	— 29,0
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	— 12,5
KNO_3	— 0,625
K_2HPO_4	— 0,033

Среду готовят на основе ОПС разведением водой до удельного веса 1,02. Эти среды как жидкие, так и агаризованные (0,6% агар-агара), используют в Институте ботаники НАН Украины [14], выдерживая водоросль на рассеянном свете при температуре 20–25°C. Пересев осуществляют раз в 2–3 месяца.

Из других сред используют среду Артари (например, в Институте физиологии растений РАН). Среда Артари содержит:

Компонент	г/л
NaCl	— 116,0
MgSO ₄ × 7H ₂ O	— 50,0
KNO ₃	— 2,5
¹ KH ₂ PO ₄	— 0,2
¹ NaHCO ₃	— 1,0
Железоаммиачные квасцы ¹	— 0,014
Микроэлементы ²	— 1,0 мл

Поскольку пропись среды Артари весьма стара [14], в литературе встречается ряд её модификаций, возникающих в процессе изучения биологии водоросли. Некоторые из них приведены ниже.

Пропись среды Абдуллаева-Семененко для условий интенсивного культивирования с высоким содержанием азота [1, 25] имеет следующий состав:

¹Соль растворяется отдельно, затем добавляется в среду.

²Состав такой же, что и для среды Тамия [10].

Компонент	г/л
KNO_3	— 5,0
KH_2PO_4	— 1,25
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	— 50,0
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	— 0,009
NaCl	— 116,0
EDTA	— 0,037
Микроэлементы	— 2 мл
Состав микроэлементов	— г/л
H_3BO_3	— 2,86
$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	— 1,81
ZnSO_4	— 0,222
MoO_3	— 0,176 4
NH_4VO_3	— 0,229 6

После приготовления и стерилизации среды её рН доводят до 7,5 с помощью 0,1 N NaOH.

Для поддержания штамма *Dunaliella* в комнатных условиях ранее использовали среду с добавлением почвенного экстракта. Поскольку при обычном комнатном режиме трудно стабилизировать факторы поддержания культуры, зависящие от погодных условий, температурного режима помещения, его естественного освещения, можно использовать среду следующего состава:

Компонент	г/л
KNO_3	— 10,0
K_2HPO_4	— 0,1
Почвенный экстракт	— 30 мл
Искусственная морская вода	— 930 мл

Приготовление почвенного экстракта. Колбу объёмом 0,5 л на 1/3 заполняют почвой (плодородной, чистой, например, садовой или огородной, без пестицидов, гербицидов и пр. токсикантов) и заливают дистиллированной водой так, чтобы уровень последней был выше на 5 см слоя почвы. Прогревают смесь на водяной бане до вскипания. Эту процедуру проделывают дважды с интервалом в одни сутки, причём длительность прогрева составляет 20 мин. Используют экстракт для приготовления среды после декантации. По составу эта среда соответствует прописи №14 из материалов [10].

Для приготовления указанной среды применяют искусственную морскую воду, которую готовят следующим образом. В 1000 мл дистиллированной воды растворяют последовательно:

Компонент	г/л
NaCl	— 60,0
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	— 10,0
KCl	— 1,5
CaSO_4	— 2,0

Далее смешивают растворы в следующем соотношении: 930 мл искусственной морской воды + 20 мл раствора калия азотнокислого + 20 мл раствора калия фосфорнокислого двухзамещенного + 30 мл почвенного экстракта. Приготовленную среду стерилизуют перед посевом культуры и охлаждают.

Таблица 1.4: Среда Ven-Amotz [49].

№	Компонент	г/л
1	NaCl	60
2	KNO ₃	0,505
3	MgSO ₄ × 7H ₂ O	1,23
4	CaCl ₂ × 2H ₂ O	0,147
5	KH ₂ PO ₄ × 7H ₂ O	0,038
6	Na ₂ EDTA	0,4
7	FeCl ₃ × 7H ₂ O	0.000 54
8	Раствор микроэлементов	1 мл/л
7	NaHCO ₃	4,2
Раствор микроэлементов		
1	MnCl ₂ × 4H ₂ O	0,000 198
2	CuCl ₂ × 4H ₂ O	0,000 1705
3	ZnCl ₂ × 4H ₂ O	0,000 1633
4	CoCl ₂ × 6H ₂ O	0,000 238
5	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ × 4H ₂ O	0,001 236

В настоящее время в практике лабораторного и промышленного культивирования широко применяется питательная среда, составленная Ven-Amotz (табл. 1.4) [49].

Среда готовится на дистиллированной воде в условиях лаборатории и на морской в промышленных условиях. На приведённых выше прописях питательной среды *Dunaliella* развивается по-разному, так как это зависит не только от состава среды и штамма, но и условий (температура, освещённость, их сочетание).

Культивирование. На сегодняшний день разработаны и применяются в промышленных условиях выращивания *D. salina* следующие типы культиваторов [37, 39, 45]:

1. Открытые бассейны с искусственным и конвекционным перемешиванием;
2. Кольцевые бассейны с лопастными роторами;
3. Полиэтиленовые мешки с барботажем воздуха;
4. Закрытые фотобиореакторы.

Наряду с культурами *Arthrospira (Spirulina) platensis* Geitl. и *Chlorella vulgaris* Beijerinck, культура *D. salina* является одной из наиболее широко используемой в мировой практике водорослевой аквакультуры [40]. Особенность культивирования трёх данных видов заключается в специфичности питательных сред для них, а

именно: высокие концентрации биогенов для *Chlorella*, бикарбоната натрия для *Arthrospira* и хлорида натрия для *Dunaliella*. При таких условиях процессы жизнедеятельности у других видов микроводорослей не могут проходить нормально, что приводит к их гибели. Данный факт позволяет использовать открытые системы культивирования для этих трёх видов, что упрощает процесс производства и, главное, удешевляет его. Использование в промышленных масштабах других видов микроводорослей ограничено из-за необходимости применения закрытых систем культивирования, предотвращающих внесение посторонних видов водорослей. Как правило, организация производства с такими системы требуют значительных денежных затрат.

Показатель производства морских водорослей в аквакультуре в 2003 г составил 10×10^6 т сырого веса [36]. Главным сдерживающим фактором в процессе развития аквакультуры является ценовой параметр. Так, скажем, от 40 до 70% затрат австралийских рыбозаводов составляют расходы на выращивание микроводорослей, являющихся кормом для рыб.

Технологический процесс выращивания *D. salina* ещё очень далек от идеального, даже если сравнивать с технологией выращивания *A. platensis*. Для последней разработаны технологии, позволяющие получать в сутки более 10 г сухой массы водорослей с 1 м². Для *D. salina* продуктивность составляет 1–2 г/(м² × сутки). И если австралийцы могут позволить себе выращивать *D. salina* в естественных водоёмах площадью в сотни

гектар, то США, Израиль, Испания, Украина гиперсолёными водоёмами таких площадей не обладают. Кроме того, если вести речь об искусственных бассейнах (культураторах), то найти для них территорию в сотни гектаров проблематично. Поэтому для этих стран более остро стоит проблема выбора между экстенсивной (низкопроизводительные системы, занимающие большие площади) и интенсивной культурами (высокопроизводительные и компактные системы). В связи с этим, в Израиле и Японии развивают технологию закрытых трубчатых фотобиореакторов с искусственным освещением культуры [45]. Они позволяют получать гораздо большую продуктивность, чем в открытых системах, на небольших территориях. К сожалению, данные преимущества нивелируются высокой стоимостью получаемой биомассы. В Испании разрабатываются закрытые трубчатые фотобиореакторы с естественным солнечным освещением суспензии клеток [48]. Данная конструкция требует больше используемой площади, но себестоимость продукции ожидается меньшей, чем в предыдущем случае. Эта система культивирования пока находится только на стадии лабораторных исследований. Параллельно разрабатывается и уже внедрена на юге Испании в полупромышленное производство система открытого культивирования, схожая с системой, разрабатываемой в Украине. Производство состоит из системы бассейнов по 20 м^2 каждый. Скорость перемешивания — $0,55 \text{ м/с}$, рабочая глубина — 10 см . При двухдневном цикле квазинепрерывной культуры, продуктив-

ность составляет $1,6 \text{ г}/(\text{м}^2 \times \text{сутки})$ [38]. В Украине при ежесуточном обмене 10% в квазинепрерывной культуре продуктивность системы составляет $2 \text{ г}/(\text{м}^2 \times \text{сутки})$. Разница в урожае, возможно, определяется различиями в используемых питательных средах.

1.3. IBSS-2 — перспективный штамм для промышленного культивирования

В предыдущих разделах упоминалось о *D. salina* как уникальном организме, способном выдержать широкую амплитуду экстремальных значений различных абиотических факторов (общей солёности, содержания и соотношения отдельных осмотически действующих и биогенных элементов, температуры, освещённости) [14]. Вследствие чего данный вид микроводорослей является удобным модельным объектом для исследования механизмов устойчивости к действию различного рода факторов среды. Также известно, что *D. salina* в определённых условиях способна к гиперсинтезу β -каротина. Его содержание может достигать 10% от сухой массы водорослей [49], что является наиболее высоким показателем по сравнению с другими продуцентами β -каротина (такими как морковь *Daucus sativus* и гриб *Blakeslea trispora*) [2]. Это позволяет считать микроводоросль *D. salina* наиболее перспективным продуцентом β -каротина для биотехнологической промышленности.

β -каротин, получаемый из растительных компонентов не токсичен, он превращается в активный витамин А в печени и кишечной трубке человека. Являясь мощным антиоксидантом, он способен превращать свободные радикалы в обычные молекулы, способствуя сохранению и восстановлению в организме витаминов С и Е. Таким образом, замедляя окислительные процессы, β -каротин замедляет старение организма. В качестве биологически активной добавки к пище рекомендуется как общеукрепляющее и профилактическое средство. Рекомендуется при следующих патологических состояниях: 1) авитаминоз и гиповитаминоз; 2) пигментный ретинит, ксерофтальмия, кератомалация и др.; 3) поражения кожи, слизистых оболочек (обморожения, ожоги, трофические язвы, обширные раны, экземы, нейродермит и др.); 4) патология легких, бронхов; воспалительные, эрозивно-язвенные поражения желудочно-кишечного тракта, цирроз печени; 5) профилактика развития опухолевого процесса в тканях; 6) профилактика образования конкрементов желчевыводящих и мочевыводящих систем. В пищевой промышленности β -каротин используется как краситель и добавляется в конфеты, хлебобулочные изделия, кондитерские изделия, макаронные изделия, напитки, сыры, молоко, масло, маргарин, соусы, майонез и др.

При промышленном культивировании одноклеточных водорослей с целью осуществления биологического синтеза ценных химических соединений важнейшую роль играет параметрическое управление процессами

жизнедеятельности продуцентов. Принцип управления зачастую реализуется не через создание оптимальных условий культивирования гидробионотов, а путем блокирования процессов клеточных делений при сохранении процессов фотосинтеза [11, 24, 28], что приводит к переключению альтернативных путей преобразования продуктов восстановления углерода в сторону накопления запасных веществ (триглицеридов, полисахаридов, каротинов), природа которых обусловлена генетическими свойствами штамма [24, 26, 28]. Генетически также определяется максимально возможное количество запасаемого вещества, например, β -каротина.

Чтобы провести сравнение трёх штаммов *D. salina* на предмет выхода максимального количества β -каротина нами были проведены специальные исследования.

Объекты исследования — три штамма зелёной галобной микроводоросли *Dunaliella salina* Teod. из коллекции культур ИнБЮМ НАН Украины: IBSS-1, IBSS-2, IBSS-3 (см. рис. 1.1).

Приборы: 1. Концентрационный фотоэлектроколориметр КФК-2. Абсолютная погрешность при измерении величины пропускания не превышает 1,0%. Размах показаний, определяющий случайную погрешность, не превышает 0,3%. Кюветы стеклянные 0,5 см; 2. Концентрационный фотоэлектроколориметр КФК-3. Абсолютная погрешность при измерении величины пропускания не превышает 0,5%. Размах показаний, определяющий случайную погрешность, не превышает 0,15%.

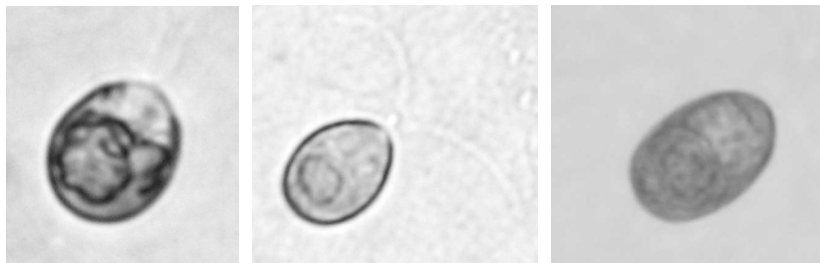


Рис. 1.1. Клетки *Dunaliella salina* Teod., штамм IBSS-1, IBSS-2 и IBSS-3

Кюветы стеклянные 0,5 см; 3. Лабораторная центрифуга ОПН-3 с радиусом ротора $r = 0,09$ м и центрифужными пробирками длиной $l = 0,07$ м. Центробежное ускорение: $a = \omega^2 R$, где ω — угловая скорость, об/с; $\omega = 2\pi n$, где n — частота вращения ротора, $R = r + l$ — радиус ротора плюс длина центрифужной пробирки.

Культиваторами служили стеклянные цилиндрические стаканы диаметром 11,7 см и объёмом 1 л, помещённые в пластиковую ванну с проточной водопроводной водой для поддержания заданной температуры. Объём культуры в каждом культиваторе составлял 300 мл при высоте слоя раствора в 3 см. Этот объём поддерживали на протяжении всего эксперимента, ежедневно доливая перед измерениями дистиллированную воду. В процессе выращивания культуру непрерывно барботировали газовой смесью с концентрацией углекислоты, обеспечивающей оптимальный рН среды (8–9 ед). Температура стабилизировалась на уровне 27–28°C посред-

ством изменения протока воды в ванне. Поверхностная освещённость каждого реактора лампой ДРЛ-700 в среднем составляла 10 клк.

Питательные среды. Водоросли выращивали на модифицированной питательной среде Ven-Amotz [49]. Модификация заключалась в замене 55 г/л хлорида натрия на 120 г/л морской соли и замене 0,000 54 г/л хлорида железа на 0,000 56 г/л цитрата железа.

Порядок проведения эксперимента. Работа выполнена на базе отдела биотехнологии и фиторесурсов Ин-БЮМ НАНУ. На первом этапе эксперимента с 1 по 7 день водоросли выращивали методом накопительных культур (см. рис. 1.2). С 7 по 14 — второй этап — для индукции гиперсинтеза β -каротина освещённость увеличили до 20 клк, уменьшив расстояние между лампой и культиваторами, температуру понизили до 23–24°C, увеличив скорость протока воды в ванне.

Измеряемые величины. В ходе эксперимента ежедневно измеряли оптическую плотность суспензии (D_{750}) на длине волны 750 нм. Величину D_{750} использовали как косвенный показатель концентрации клеток в суспензии. Переход от единиц оптической плотности к величине абсолютно сухого веса (АСВ), осуществляли посредством эмпирического коэффициента $k = 0,78 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{ед. опт. пл}^{-1}$, $ACB = k \cdot D_{750}$.

На 6-й и 14-й дни эксперимента определяли пигментный состав клеток трёх штаммов *D. salina*.

Объём плотного осадка. Биомассу в пробе определяли объёмно-весовым методом [32]. Для этого из культива-

тора после тщательного перемешивания культуры отбирали 5 мл суспензии клеток микроводоросли. Суспензию переносили в специальные капиллярные пробирки (у которых объём одного деления капилляра соответствует 0,002 мл) и центрифугировали при 3 000 об/мин в течении 15 мин. По завершению центрифугирования проводили определение величины объёма осаждённых клеток по числу делений на капилляре. Пересчет единиц объёма биомассы на единицы абсолютно сухого веса осуществляли посредством эмпирического коэффициента $k = 0,22 \text{ г} \cdot \text{мл}^{-1}$.

Количественное определение пигментов. Для этой цели отбирали суспензию каждого штамма объёмом по 10 мл [8]. Клетки осаждали центрифугированием при 3 000 об/мин в течение 15 мин. Пигменты экстрагировали из клеток смесью хлороформ:этанол (2:1) до полного извлечения пигментов (обесцвечивания экстракта). Оптическую плотность экстрактов измеряли на длинах волн, соответствующих максимумам поглощения измеряемых пигментов с помощью КФК-3. Концентрацию суммарных каротиноидов рассчитывали по формуле [46]:

$$C = k \cdot \frac{D_{480} \cdot V}{m \cdot 1000} \cdot 100\%, \quad (1.1)$$

где: D_{480} — оптическая плотность на длине волны 480 нм, V — объём экстрактов, мл, m — масса навески, мг, $k = 1/(\varepsilon \cdot l)$ — объединённый коэффициент для каротиноидов равный 4, мг/л; l — длина оптического

пути, см; ε — постоянная, зависящая от свойств растворённого вещества и длины световой волны, л/(мг·см).

Концентрацию хлорофилла a рассчитывали по формуле [46]:

$$C = \frac{k_a D_{644} - k_b D_{647} - k_c D_{630}}{m \cdot 1000} \cdot V \cdot 100\%, \quad (1.2)$$

где: D — оптическая плотность, V — объём экстракта, мл, m — масса навески, мг, $k = 1/(\varepsilon \cdot l)$ — объединённый коэффициент: для хлорофилла a (k_a) равный 11,85, мг/л; для хлорофилла b (k_b) равный 1,54, мг/л; для хлорофилла c (k_c) равный 0,08, мг/л; l — длина оптического пути, см; ε — постоянная, зависящая от свойств растворённого вещества и длины световой волны, л/(мг·см).

Накопительная кривая роста водорослей характеризовалась отсутствием заметных лаг- и логарифмической фаз в связи с высокой начальной плотностью культуры. Динамика биомассы показана на рисунке 1.2. С 1-х по 7-е сутки наблюдался линейный рост культур. При микроскопировании наблюдали активнодвигающиеся зелёные клетки каплеобразной (IBSS-1), грушевидной (IBSS-2) или вытянутой (IBSS-3) формы (см. рис. 1.1). Изменив условия для индукции каротиногенеза, наблюдали переход культуры по биомассе в фазу стационарного роста. При микроскопировании форма клеток становилась округлой, клетки увеличивались в размерах и снижали свою двигательную активность. Визуально фиксировали последовательную смену цвета

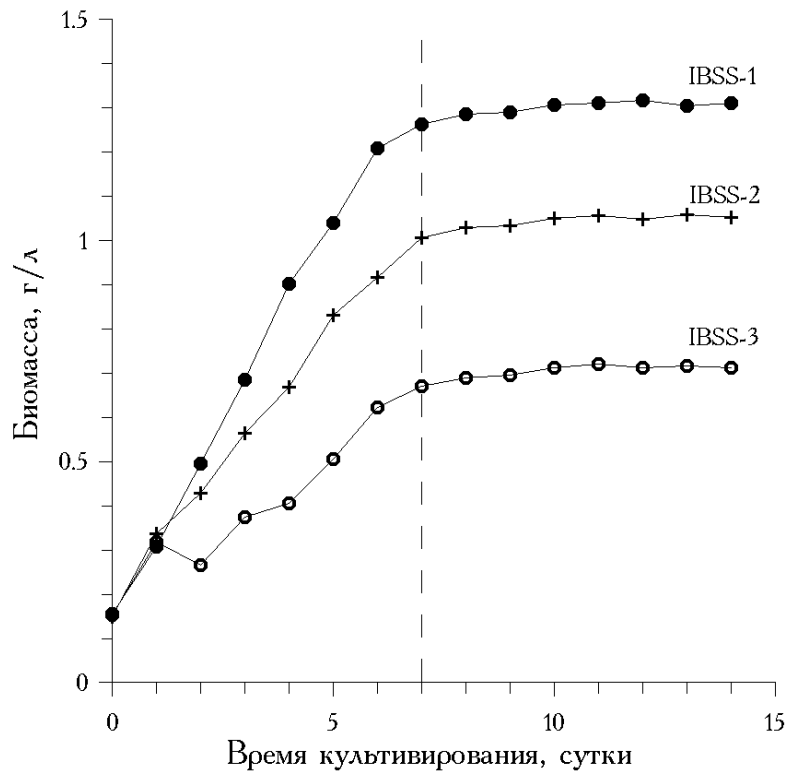


Рис. 1.2. Динамика биомассы 3-х штаммов *Dunaliella salina* Теод. в накопительной культуре. Пунктирной линией отмечен момент изменения условий культивирования.

культуры от зелёного к жёлтому, затем к оранжевому. Сравнительные данные по пигментному составу приведены в таблице 1.5.

Таблица 1.5: Содержание пигментов в клетках и суспензии «зелёной» (6-й день эксперимента) и «оранжевой» (14 день) *Dunaliella salina* Teod. Хл *a* — хлорофил *a*, Саг — общие каротиноиды.

Штамм	6-й день		14-день	
	Хл <i>a</i>	Саг	Хл <i>a</i>	Саг
	% АСВ		% АСВ	
IBSS-1	1,40	0,30	—	0,60
IBSS-2	1,48	1,80	—	2,03
IBSS-3	0,10	0,50	—	1,40
	г/л суспензии		г/л суспензии	
IBSS-1	—	0,004	—	0,008
IBSS-2	—	0,018	—	0,021
IBSS-3	—	0,003	—	0,010

Условия индуцирования гиперсинтеза β -каротина вызвали повышение доли каротиноидов к 14-му дню эксперимента у IBSS-3 на 300%, у IBSS-1 на 200% и у IBSS-2 на 11% в сравнении с данными 6-го дня эксперимента, что свидетельствует о генетической детерминации высокого содержания каротиноидов у IBSS-2 и IBSS-3 и низкой нормы реакции у IBSS-2 на воздей-

ствия окружающей среды. Из 3-х исследованных штаммов как «зелёная», так и «оранжевая» форма штамма IBSS-2 отличаются наибольшим содержанием каротиноидов как в биомассе, так и в пересчёте на объём суспензии микроводорослей.

Согласно работе [1], выход каротина значительно больший из «зелёной» культуры при её активном росте, чем из «оранжевой» за счёт быстрого прироста клеток. Но IBSS-1, продемонстрировав наилучшие ростовые характеристики, по содержанию каротиноидов показал наименьшие значения. Для трёх исследуемых штаммов после перехода культур в стадию стационарного роста клеткам *D. salina* для накопления каротиноидов потребовалась целая неделя.

Элементарный расчёт показывает, что по прошествии двух недель промышленного выращивания водорослей для штамма IBSS-1 выход каротиноидов будет одинаковым как при одно-, так и при двухстадийном процессе культивирования. Для штамма IBSS-3 при двухстадийном процессе количество каротиноидов будет на 40% выше, чем при одностадийном процессе. Для штамма IBSS-2 одностадийный процесс более выгоден в связи с высокими продукционными характеристиками роста при высоком содержании каротиноидов в «зелёной» биомассе.

В абсолютных значениях выход каротиноидов будет наибольшим у IBSS-2 из трёх исследованных штаммов: 0,36 или 0,21 г/м² в сутки.

Таблица 1.6: Выход каротиноидов *Dunaliella salina* Теод. при одно- и двухстадийном процессе культивирования.

Штамм	Одностадийный	Двухстадийный
	Содержание каротиноидов, г/л	
IBSS-1	0,004	0,008
IBSS-2	0,018	0,021
IBSS-3	0,003	0,010
	Выход каротиноидов, г/м ² ·сутки	
IBSS-1	0,08	0,08
IBSS-2	0,36	0,21
IBSS-3	0,06	0,10

Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных можно заключить: *Dunaliella salina* Теод. IBSS-2 — штамм, перспективный для промышленного культивирования.

1.4. Рост *Dunaliella salina* в смешанной культуре

Выращивание *Dunaliella salina* в культиваторах открытого типа (бассейнах) в условиях производства в промышленных масштабах, как правило, сопровождается трудностями поддержания альгологической чистоты

культуры, поскольку практически невозможно исключить попадание в культиваторы других видов микроводорослей. Зачастую с целью снижения себестоимости продукта на производстве для приготовления питательных сред в больших объёмах используют нестерильную морскую соль и воду, что приводит к систематическому заражению культуры другими видами микроводорослей, клетки (споры) которых присутствуют в используемой воде и, как следствие, попадают в питательные среды. Ясно, что в большинстве случаев заражение культуры *D. salina* крайне нежелательно, особенно при использовании полученной биомассы в качестве пищевой добавки или сырья для медицинских целей.

Наибольшую опасность систематическое заражение представляет для проточной культуры с низкой плотностью из-за целого ряда причин: 1) при малой плотности *D. salina* увеличивается вероятность сукцессии, 2) в процессе культивирования *D. salina* биомасса сопутствующей альгофлоры также увеличивается, следовательно, доля непродуктивного использования субстрата увеличивается и, наконец, 3) сопутствующие виды микроводорослей могут быть токсичными.

Эти обстоятельства вынуждают исследовать рост смешанной культуры для управления динамикой популяций и достижения заданных пропорций различных видов в смешанной культуре. Для этой цели был проведён эксперимент по культивированию *Dunaliella salina* в условиях систематического внесения клеток других видов микроводорослей с питательной средой.

Объект исследования. Зелёная галобная микроводоросль *Dunaliella salina* Teod. (штамм IBSS-1) из коллекции культур Л. А. Ланской (ИнБЮМ НАНУ) с сопутствующей альгофлорой. Принадлежность сопутствующей альгофлоры к классам цианобактерий и диатомей определена А. Б. Боровковым.

Приборы: 1. Камера Горяева; 2. Световой микроскоп МБИ-10, увеличение 360; 3. Концентрационный фотоэлектроколориметр КФК-2 (характеристики прибора приведены на странице 40); 4. Ртутный термометр 0–50°C, с погрешностью $\pm 0,5$; 5. Аквариумный компрессор «Махіта», производительность 4,8 л/мин; 6. Аквариумный электронасос «Струмок», производительность 1,5 л/мин.

Культиватором служил прямоугольный бассейн, описание которого представлено на странице 62 (см. рис. 2.1).

Питательные среды. Для культивирования использовали модифицированную питательную среду Ven-Amotz [49] (табл. 1.7). Для её приготовления использовали пресную воду из скважины, расположенной на территории предприятия. Источником NaCl, MgSO₄, CaCl₂ служила морская соль.

Таблица 1.7: Модифицированная среда Ven-Amotz [49].

№	Компонент	г/л
1	NaCl	60

2	KNO_3	0,505
3	$\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,038
4	Na_2EDTA	0,4
5	$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,000 54
6	Раствор микроэлементов	1 мл/л
7	NaHCO_3	4,2
Раствор микроэлементов		
1	$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	0,000 198
2	$\text{CuCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	0,000 1705
3	$\text{ZnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	0,000 1633
4	$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,000 238
5	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$	0,001 236

Порядок и условия проведения эксперимента. Работа выполнена на базе предприятия «Кайлас» (г. Симферополь, Крым) с 23 июня по 25 октября 2004 г. Культиваторы размещались в стандартной стеклянной теплице для выращивания сельскохозяйственных культур. В эксперименте водоросли выращивали при естественном освещении методом квазинепрерывных культур. Ежесуточно осуществляли 10% обмен среды, т. е. удельная скорость протока составляла $0,1 \text{ сут}^{-1}$. Максимальная освещённость в географический полдень (12^{30}) достигала 110 клк. Суточная температура колебалась в пределах 24–36°C (первые два этапа эксперимента) и 16–28°C (третий этап эксперимента). Второй этап эксперимента начался после перехода смешанной культуры

в стационарную фазу роста, в ходе которого солёность среды повысили от 60 г/л до 120 г/л. Третий этап — механическая очистка культуры *D. salina* от сопутствующей альгофлоры. По достижении сообществом равенства удельных скоростей роста и протока среды выкачали (без перемешивания) основной объём суспензии водорослей из бассейна, оставив осадок на дне (слой 0,5 см). Затем, тщательно вымыв дно и стенки бассейна от осадка, вернули культуру *D. salina* обратно. После механической чистки культуры режим выращивания при 120 г/л морской соли в питательной среде и удельной скорости протока $0,1 \text{ сут}^{-1}$ поддерживался до конца эксперимента.

Измеряемые величины. Ежедневно измеряли температуру, оптическую плотность D_{750} на длине волны 750 нм и вели подсчёт числа клеток, млн/мл.

Поскольку для приготовления питательных сред использовали воду из скважины, которая содержала клетки диатомовых микроводорослей и цианобактерий, заражение культуры *D. salina* было неизбежным. Оптическая плотность культуры возрастала пропорционально росту числа клеток *D. salina* на единицу объёма. Популяция цианобактерий характеризовалась более высокой удельной скоростью роста, но это не сказывалось на динамике оптической плотности всего сообщества (рис. 1.3).

Визуально регистрировали, что цианобактерии были представлены цилиндрическими клетками, размер

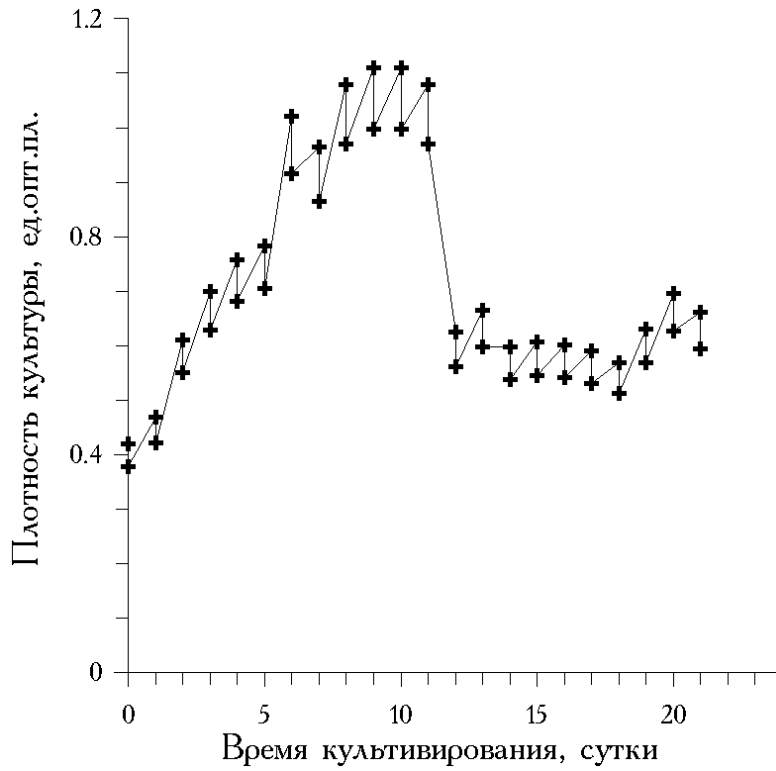


Рис. 1.3. Динамика оптической плотности смешанной культуры *D. salina*, диатомовых микроводорослей и цианобактерий в квазинепрерывном режиме.

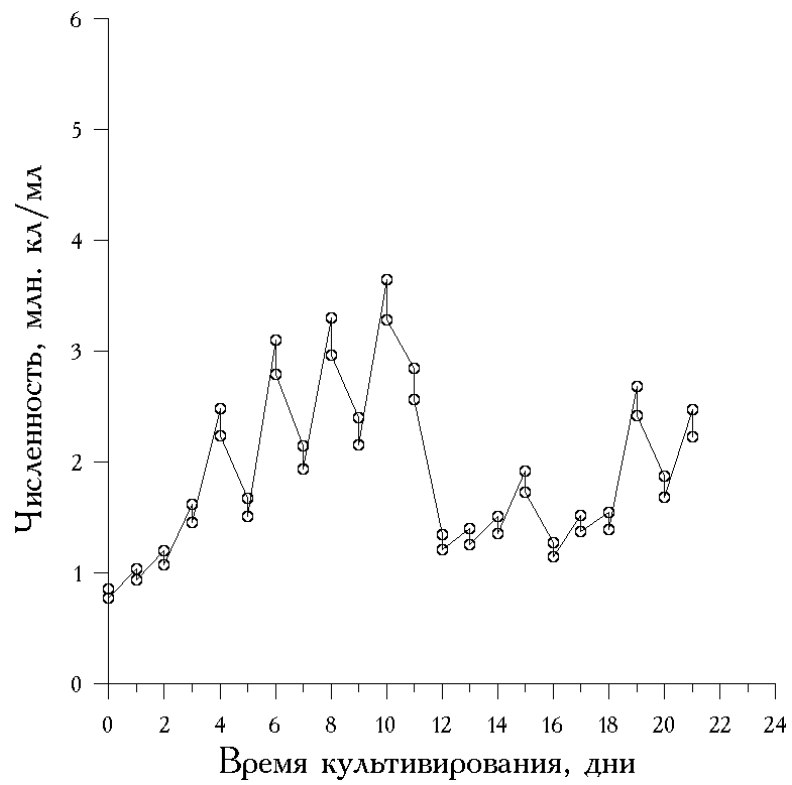


Рис. 1.4. Динамика численности популяции *D. salina* в квазинепрерывной режиме.

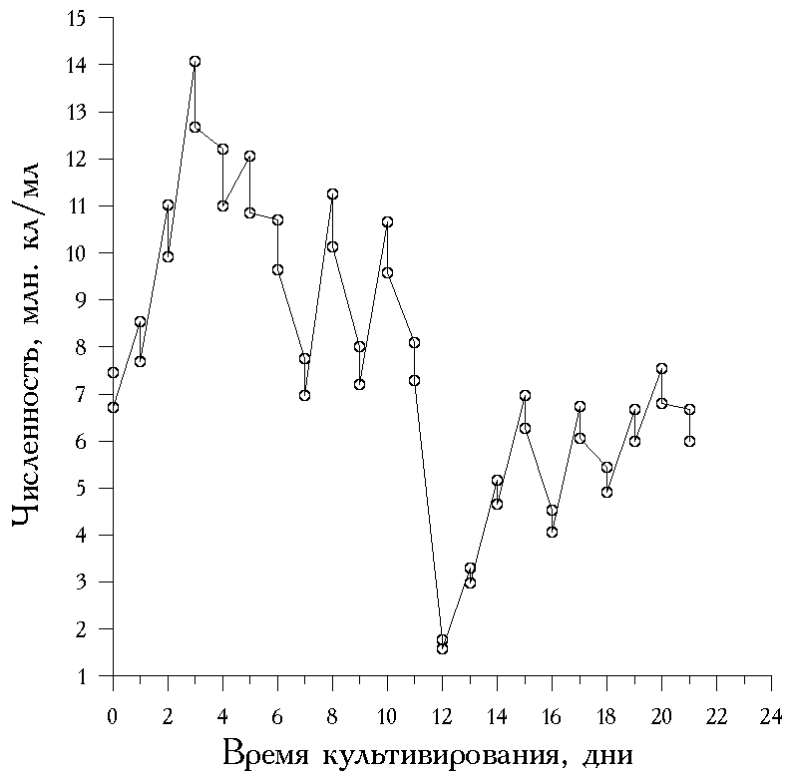


Рис. 1.5. Динамика численности популяции цианобактерий в квазинепрерывной режиме.

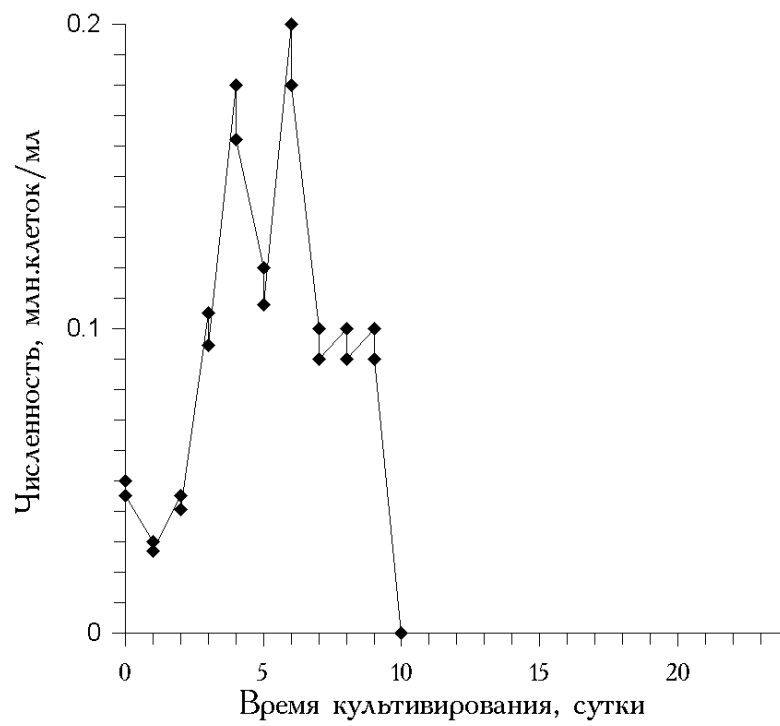


Рис. 1.6. Динамика численности популяции диатомовых водорослей в квазинепрерывном режиме.

которых был в несколько раз меньше, чем клетки *D. salina*. Наблюдалось незначительное возрастание численности диатомей (рис. 1.6). Стационарная фаза роста сообщества характеризовалась следующими показателями: D_{750} — 0,78 ед. опт. пл, *D. salina* — 1,5 млн. кл/мл, цианобактерии — 12,7 млн. кл/мл, диатомей — 0,2 млн. кл/мл. После повышения солёности на втором этапе эксперимента наблюдали резкое повышение значения оптической плотности культуры (рис. 1.3), незначительное повышение числа клеток *D. salina* (рис. 1.4) и снижение числа клеток цианобактерий (рис. 1.5). Постепенно происходила смена цианобактерий в бассейне: цилиндрических клеток становилось меньше, но появился новый вид, представленный одиночными клетками значительно меньших размеров. Численность диатомей в первый же день снизилась вдвое после повышения солёности и на 4-й день данный вид при микроскопировании уже не обнаруживался (рис. 1.6).

При достижении сообществом равенства удельных скоростей роста и протока питательной среды при повышенной солёности наблюдали следующие значения плотности культуры: D_{750} — 1,1 ед. опт. пл, *D. salina* — 3,6 млн. кл/мл, цианобактерии — 10,6 млн. кл/мл. После механической чистки бассейна на третьем этапе культивирования наблюдали двухкратное снижение числа клеток *D. salina*, двухкратное снижение оптической плотности и пятикратное снижение численности цианобактерий (рис. 1.5). При этом цилиндрические

клетки цианобактерий исчезли окончательно и остались только одиночные круглые. Через 3 дня после механической чистки сообщество характеризовалось следующими показателями: D_{750} — 0,61 ед. опт. пл, *D. salina* — 2,4 млн. кл/мл, цианобактерии — 6,6 млн. кл/мл. Возможно, снижение указанных показателей произошло вследствие снижения температуры (рис. 1.4).

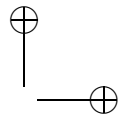
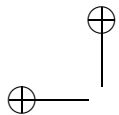
Механическую чистку бассейна можно рассматривать как один из способов осуществления непропорционально-проточного режима культивирования. Данный режим позволяет выращивать смешанные культуры организмов с заданным соотношением видов в альгоценозе.

Таким образом, на основе результатов проведённых экспериментов можно дать следующие рекомендации: 1) для поддержания альгологической чистоты в культуре при выращивании *D. salina* в культиваторах открытого типа при систематическом внесении цианобактерий или диатомей уровень солёности в среде необходимо повысить до 120 г/л хлорида натрия (морской соли); 2) необходимо систематически (1–2 раза в три дня) проводить механическую чистку дна и боковых стен бассейнов; 3) стабилизировать среднесуточную температуру суспензии микроводоросли на уровне 23°C (18–28°C), так как понижение температуры до этого уровня незначительно снижает прирост *D. salina* и существенно снижает прирост цианобактерий.

При случайном (единичном) внесении цианобакте-

рий или диатомей извне рекомендуется временно поднять уровень солёности до 120 г/л. Этот уровень поддерживать до полного вымывания сопутствующей альгофлоры из культиватора в условиях проточной культуры.

Ещё раз подчеркнём, вышеприведённые способы борьбы с заражением культуры *D. salina* другими видами микроводорослей наиболее действенны при солёности среды 120 г/л хлорида натрия.

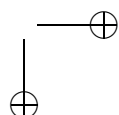
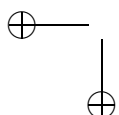


ГЛАВА 2

Оптимизация процессов культивирования *Dunaliella*

2.1. Оптимизация времени включения протока и величины удельной скорости протока

При выращивании микроводорослей в стандартной сельскохозяйственной теплице, при естественном освещении, в культиваторах открытого типа (бассейнах) сроки культивирования, как правило, ограничиваются тёплым временем года, поскольку затраты на поддержание температурного режима в теплице в значительной степени повышают себестоимость получаемой биомассы микроводорослей. По времени весь процесс производства условно можно разделить на два этапа: первый этап — накопительное культивирование, т. е. ино-



кулят вместе с питательной средой заливают в бассейны. При этом урожай не собирают до тех пор, пока плотность культуры не достигнет заранее заданного значения (рабочей плотности); второй этап — организация проточной культуры (непрерывное культивирование). При этом значение удельной скорости протока питательной среды подбирается таким образом, чтобы производительность системы культивирования была максимальной. Поскольку оптимизацию производства биомассы *Dunaliella salina* проводят, как правило, с целью достижения максимального урожая, возникает задача оптимизации двух величин: удельной скорости протока среды и момента включения протока.

Рассмотрим данный вопрос с применением методов математического моделирования, с использованием экспериментальных данных, полученных в условиях промышленного культивирования *Dunaliella salina*.

Объект исследования. Зелёная галобная микроводоросль *Dunaliella salina* из коллекции культур ИнБЮМ НАНУ.

Приборы: 1. рН-метр-милливольтметр рН-150М, абсолютная погрешность $\pm 0,05$; 2. Концентрационный фотоэлектроколориметр КФК-2. Абсолютная погрешность при измерении величины пропускания не превышает 1,0%. Размах показаний, определяющий случайную погрешность не превышает 0,3%. Кюветы стеклянные 0,5 см; 3. Люксметр Ю-116 с погрешностью не более 5% от измеряемой величины; 4. Ртутный термо-

метр 0–50°C, с погрешностью $\pm 0,5$; 5. Аквариумный компрессор «Махіта», производительность 4,8 л/мин; 6. Аквариумный электронасос «Струмок», производительность 1,5 л/мин.

Культиватором служил прямоугольный бассейн 2×2,5 м из пищевой полиэтиленовой плёнки толщиной 150 мкм, уложенной на выровненную поверхность грунта и закреплённой на ограждающих конструкциях с помощью деревянных планок. Культиватор размещали в стандартной стеклянной теплице для выращивания сельскохозяйственных культур. Объём суспензии в культиваторе составлял 250 л при высоте слоя 5 см. Этот объём поддерживали на протяжении всего эксперимента, ежедневно добавляя пресную воду до отметки 5 см. Культуру постоянно перемешивали с помощью аквариумного электронасоса «Струмок». Суспензию микроводорослей барботировали воздухом с помощью аквариумного компрессора «Махіта». Общий вид культиватора представлен на рисунке 2.1.

Питательные среды. В работе использовали модифицированную питательную среду Тренкеншу (табл. 2.1) [32]. Для приготовления питательной среды использовали пресную воду из скважины, расположенной на территории предприятия. Источником NaCl, MgSO₄, CaCl₂ в среде служила морская соль.

Условия проведения эксперимента. Работа выполнена на базе предприятия «Кайлас» (Крым) в июне 2004 г. В эксперименте водоросли выращивали при естественном освещении методом накопительных куль-

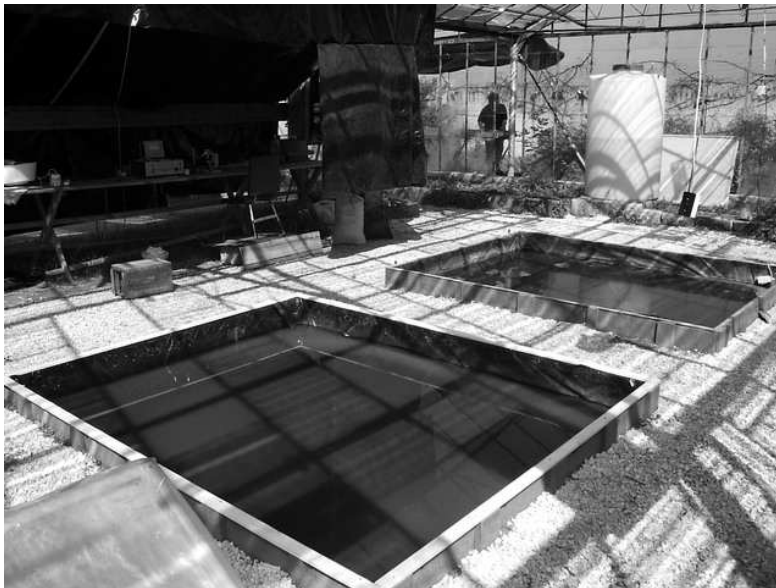


Рис. 2.1. Общий вид экспериментального культиватора, расположенного в теплице.

тур. Максимальная освещённость в географический полдень (12^{30}) достигала 110 клк. Суточная температура суспензии колебалась в пределах 18–28°C.

Таблица 2.1: Модифицированная питательная среда Тренкеншу.

№	Компонент	Класс	Навеска, г/л
1	Морская соль	тех	60
2	KNO_3	тех	2,139
3	$\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	тех	0,365
4	Na_2EDTA	ч	0,040
5	$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	ч	0,040
6	$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	хч	0,008
7	$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	хч	0,00625
8	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$	хч	0,00183
9	$\text{K}_2\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_4 \times 24\text{H}_2\text{O}$	чда	0,00238

Измеряемые величины. Ежедневно измеряли рН среды и оптическую плотность (D_{750}) на длине волны 750 нм. Переход от единиц оптической плотности к величине абсолютно сухого веса (АСВ) осуществляли посредством эмпирического коэффициента $k = 0,78 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{ед. опт. пл.}^{-1}$, $\text{АСВ} = k \cdot D_{750}$. Также ежедневно проводили измерение температуры.

Постановка задачи. Пусть имеется культиватор открытого типа (бассейн) с неизменным рабочим объёмом

суспензии микроводорослей. Пусть процесс культивирования состоит из двух этапов: 1) накопительный и 2) непрерывный (хемостат), — который начинается в момент включения протока питательной среды, причём это может быть осуществлено только в фазе линейного роста накопительной кривой. Также будем считать, что удельная скорость протока такова, что условие линейности роста не нарушается. Считая урожаем ту биомассу, которая выносится с протоком на втором этапе, найти оптимальные значения момента включения протока и удельной скорости протока питательной среды с целью получения максимального урожая. Пусть также процессы адаптации клеток и автоселекции не учитываются.

Модель. Производительность, как характеристика системы культивирования, непосредственно определяется скоростью роста микроводорослей. В свою очередь, скорость роста зависит от биологических особенностей вида водорослей и ряда физико-химических условий культивирования. Чтобы выявить характеристики роста микроводорослей, выращенных в конкретных условиях, достаточно проследить динамику роста (накопительная кривая) [31]. На основе формы этой кривой легко установить две наиболее важные характеристики фаз роста: продуктивность и удельную скорость роста — именно они вместе с величиной самой биомассы определяют производительность системы культивирования. В данной работе все расчёты режима культивирования мик-

роводорослей основаны на теории хемостата [33]. Этот режим предпочтительнее из-за простоты реализации на практике.

Следующим шагом является выбор начального условия, т. е. момента включения протока, который бы привёл к максимальным показателям величины урожая по окончании процесса культивирования. Выбор лежит между логарифмической и линейной фазами роста, тогда как другие, учитывая нашу задачу, не подлежат рассмотрению. Из этих двух фаз линейная более предпочтительна по следующим причинам: 1) в реальности длительный логарифмический рост микроводорослей наблюдается крайне редко; 2) линейная фаза характеризуется величиной максимальной продуктивности, которая постоянна для любой точки линейного роста. Кроме того, на линейном участке, в отличие от логарифмического, продуктивность не зависит от плотности культуры; 3) состояние динамического равновесия (равенство величин удельной скорости протока и удельной скорости роста) при включении протока на линейном участке обладает свойством устойчивости, т. е. любое случайное отклонение от стационарного состояния по плотности приведёт к переходному процессу, который возвратит культуру к исходному состоянию; 4) плотность культуры в любой точке линейной фазы выше в сравнении с логарифмической. Это означает, что культура в линейной фазе роста, с одной стороны, более эффективно использует свет, что весьма актуально особенно в пасмурные дни, с другой — получение одинако-

вых показателей по урожаю в линейной фазе роста, по сравнению с логарифмической, требует меньшей скорости протока. Меньший объём сливаемой суспензии в значительной мере снижает расход питательных сред и усилия по сбору урожая, что является неоценимым преимуществом с экономической точки зрения.

Приведём основные выражения для линейной фазы роста накопительной кривой [31].

Динамика плотности культуры в пределах линейной фазы роста:

$$B = P_m \cdot (t - t_l) + B_l, \quad (2.1)$$

где B — биомасса, $\text{г} \cdot \text{м}^{-2}$; $P_m = \text{const}$ — максимальная продуктивность, $\text{г} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сут}^{-1}$; t — время, сут ; B_l — биомасса в начале линейной фазы роста, т. е. при $t = t_l$.

Динамика плотности культуры в хемостате (в рамках линейного роста):

$$B = \frac{P_m}{\omega} - \left(\frac{P_m}{\omega} - B_0 \right) \cdot e^{-\omega \cdot (t - t_0)}, \quad (2.2)$$

где ω — удельная скорость протока, сут^{-1} ; B_0 — биомасса в момент включения протока t_0 , $B_l \leq B_0 \leq B^l$, B^l — биомасса в конце линейного роста при t^l .

Рассматривая стационарный процесс с учётом выражения (2.2), можно утверждать, что плотность культуры определяется двумя величинами: продуктивностью и удельной скоростью протока [7]. В условиях стационарного процесса урожай равен произведению продуктивности и времени культивирования. Поэтому величина

урожая не зависит от рабочей плотности культуры, т. е. варьируя величину ω , мы можем изменить плотность культуры, но это никак не отразится на величине урожая.

Для любых переходных процессов плотность культуры будет функцией от времени. Скорость выноса биомассы определяется произведением удельной скорости протока и плотности культуры, поэтому с учётом (2.2) имеем:

$$v_B = \omega \cdot B(t) = P_m - (P_m - \omega \cdot B_0) \cdot e^{-\omega \cdot (t-t_0)}. \quad (2.3)$$

При фиксированном значении ω точка включения протока (B_0, t_0) и отрезок времени $[t_0, t_f]$ определяют величину урожая:

$$\begin{aligned} Y &= \int_{t_0}^{t_f} [P_m - (P_m - \omega \cdot B_0) \cdot e^{-\omega \cdot (t-t_0)}] dt = \\ &= (t_f - t_0) P_m - (P_m - \omega \cdot B_0) \left[-\frac{1}{\omega} \cdot e^{-\omega \cdot (t-t_0)} \right]_{t_0}^{t_f} = \\ &= (t_f - t_0) P_m + (P_m - \omega \cdot B_0) \cdot \frac{1}{\omega} [e^{-\omega \cdot (t_f-t_0)} - 1] = \\ &= (t_f - t_0) \cdot P_m - \left(\frac{P_m}{\omega} - B_0 \right) \cdot [1 - e^{-\omega \cdot (t_f-t_0)}]. \end{aligned} \quad (2.4)$$

Момент включения протока t_{opt} , определяющий максимальный урожай при фиксированном ω , можно

найти из условия равенства нулю производной по t_0 выражения (2.4). Подставляя выражение

$$B_0 = P_m \cdot (t_0 - t_l) + B_l, \quad (2.5)$$

в выражение (2.4)

$$Y = (t_f - t_0) \cdot P_m - \left(\frac{P_m}{\omega} - P_m(t_0 - t_l) - B_l \right) \times \\ \times [1 - e^{-\omega \cdot (t_f - t_0)}]$$

и дифференцируя по t_0 , получим

$$\frac{dY}{dt_0} = -P_m - (-P_m) \cdot [1 - e^{-\omega \cdot (t_f - t_0)}] + \\ + \left(\frac{P_m}{\omega} - P_m(t_0 - t_l) - B_l \right) \cdot \omega \cdot e^{-\omega \cdot (t_f - t_0)} = \\ = -P_m + P_m - P_m \cdot e^{-\omega \cdot (t_f - t_0)} + \\ + (P_m - \omega \cdot P_m(t_0 - t_l) - \omega \cdot B_l) \cdot e^{-\omega \cdot (t_f - t_0)}.$$

И наконец,

$$\frac{dY}{dt_0} = [-\omega \cdot P_m \cdot (t_0 - t_l) - \omega \cdot B_l] \cdot e^{-\omega \cdot (t_f - t_0)} = 0.$$

Отсюда

$$t_0 = t_{opt} = t_l - \frac{B_l}{P_m}$$

Поскольку $t_{opt} < t_l$, ясно, что оптимальное значение момента включения протока лежит за пределами линейной фазы роста (рис. 2.2). На линейном участке накопительной кривой функция $Y = Y(t_0)$ убывает. Следовательно, момент включения протока, соответствующий максимальному урожаю, совпадает с моментом начала линейного роста. Заметим, точка начала линейного роста характеризуется максимальной продуктивностью и максимальной удельной скоростью роста микроводорослей.

Величины ω и B_0 в выражении (2.4) определены в промежутках $B_l \leq B_0 \leq B^l$, т. е. ограничены минимальной и максимальной плотностью культуры в рамках линейного роста.

Соответственно, удельная скорость протока будет ограничена пределами

$$\frac{P_m}{B_l} \leq \omega \leq \frac{P_m}{B^l}, \quad \omega_{max} \leq \omega \leq \omega_{min},$$

что даёт четыре замечательных случая в выборе режима культивирования с различными удельной скоростью протока и начальной биомассой, два из которых — стационарные динамические состояния (рис. 2.3). При максимальной удельной скорости протока

$$\omega_{max} = \frac{P_m}{B_l}$$

проведём сравнение между двумя случаями: 1) проток включён в начале линейного роста t_l ; 2) проток включён

в конце линейного роста t^l . Выражение (2.4) принимает соответствующий данным случаям вид:

$$Y \left(t_0 = t_l, \omega = \frac{P_m}{B_l} \right) = (t_f - t_l) \cdot P_m; \quad (2.6)$$

$$Y \left(t_0 = t^l, \omega = \frac{P_m}{B_l} \right) = (t_f - t^l) \cdot P_m + (B^l - B_l) \left[1 - e^{-P_m/B_l(t_f-t^l)} \right]. \quad (2.7)$$

Во втором случае в момент включения протока t^l урожай для первого составит $(t^l - t_l) \cdot P_m$ (т. е. урожай за промежуток времени $[t_l, t^l]$). Из (2.7) следует, что с увеличением времени культивирования разница в урожае будет уменьшаться. И при $t_f \rightarrow \infty$ урожай будет одинаков для обоих случаев (рис. 2.4).

Аналогичное сравнение можно провести для t_l и t^l при минимальной удельной скорости протока

$$\omega_{min} = \frac{P_m}{B^l},$$

которое также покажет целесообразность включения протока в начале линейного роста (рис. 2.5)

$$Y \left(t_0 = t_l, \omega = \frac{P_m}{B^l} \right) = (t_f - t_l) \cdot P_m - (B^l - B_l) \left[1 - e^{-P_m/B^l(t_f-t_l)} \right], \quad (2.8)$$

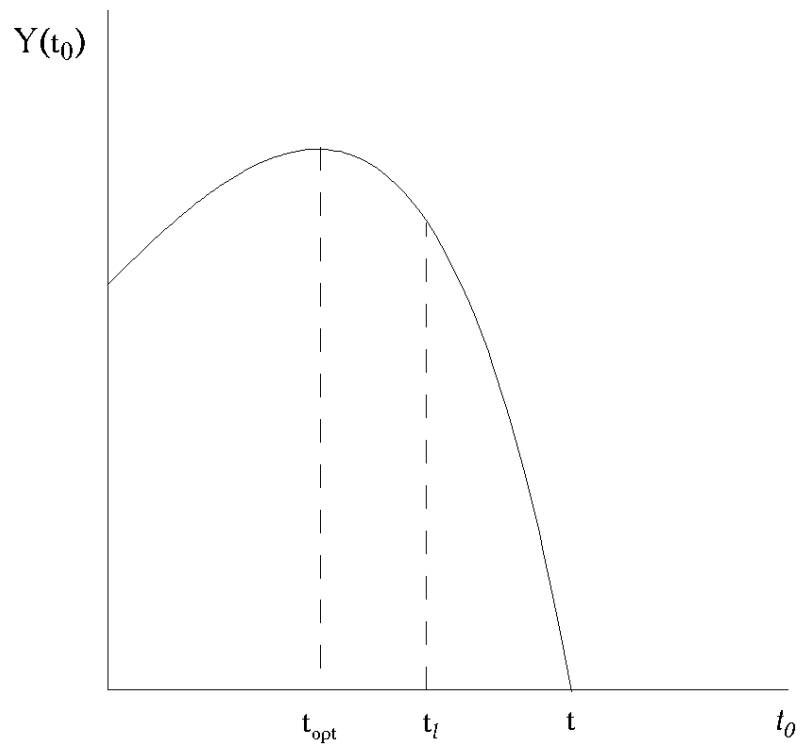


Рис. 2.2. Зависимость величины урожая от момента включения протока.

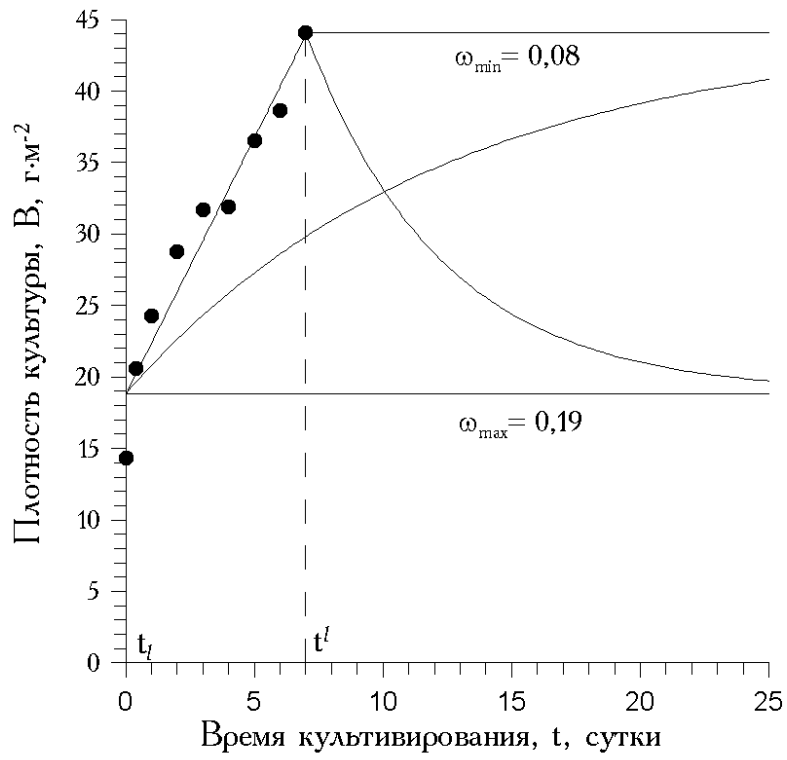


Рис. 2.3. Теоретические кривые динамики плотности (B) культуры *Dunaliella salina* Теод. для максимальной и минимальной скоростей протока, для двух моментов включения протока в начале и в конце линейного роста.

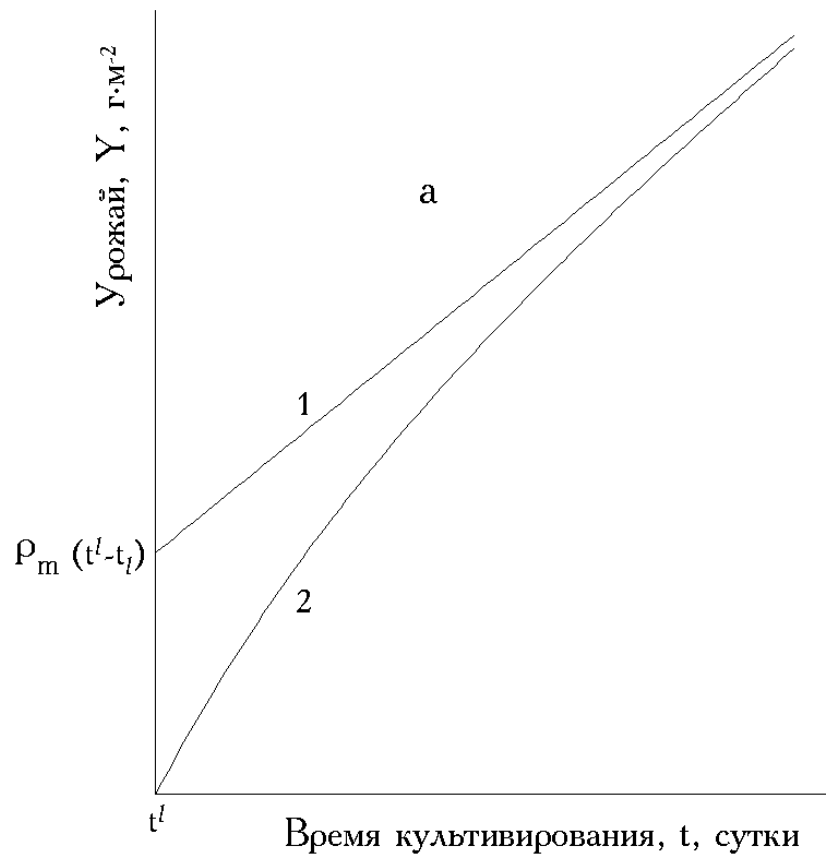


Рис. 2.4. Сравнительная оценка величины урожая при максимальной удельной скорости протока: проток включён в начале (1) и в конце (2) линейного роста.

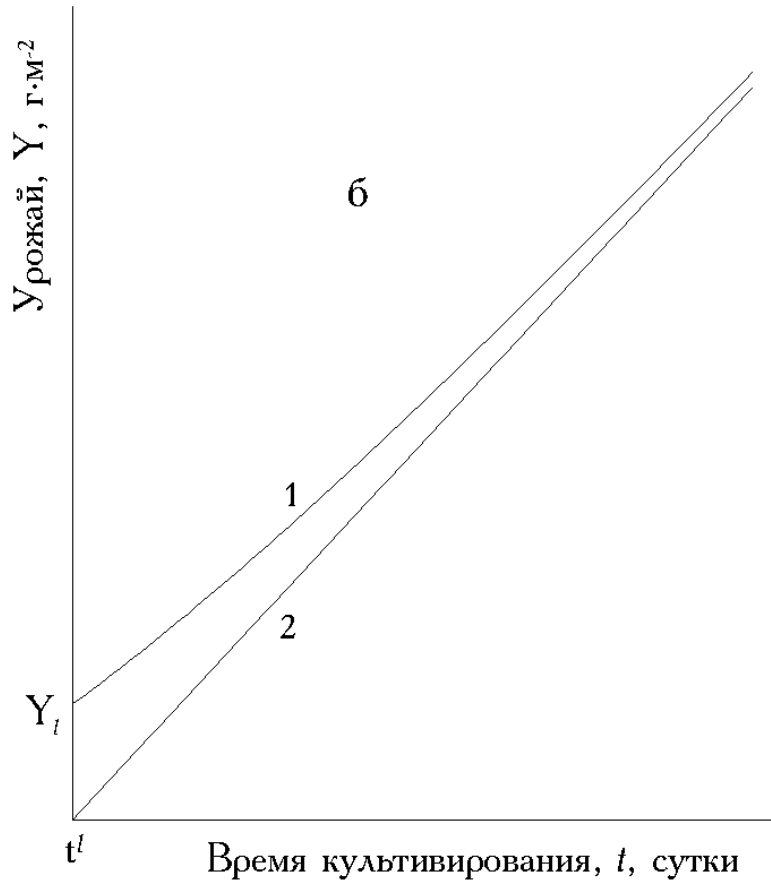


Рис. 2.5. Сравнительная оценка величины урожая при минимальной удельной скорости протока: проток включён в начале (1) и в конце (2) линейного роста. Y_t — урожай на момент t^l .

$$Y \left(t_0 = t^l, \omega = \frac{P_m}{B^l} \right) = (t_f - t^l) \cdot P_m. \quad (2.9)$$

Если биомассу B , находящуюся в культиваторе на момент времени t_f , отнести также к урожаю, то

$$Y + B = (t_f - t_0) \cdot P_m - \left(\frac{P_m}{\omega} - B_0 \right) \cdot [1 - e^{-\omega \cdot (t_f - t_0)}] + \\ + \frac{P_m}{\omega} - \left(\frac{P_m}{\omega} - B_0 \right) \cdot e^{-\omega \cdot (t_f - t_0)} = (t_f - t_0) \cdot P_m + B_0.$$

Учитывая (2.5), урожай, очевидно, будет равен

$$P_m \cdot (t_f - t_l) + B_l.$$

Применение модели. На рис. 2.3 представлена аппроксимация экспериментальных данных линейной фазы накопительной кривой и расчёт динамики плотности культуры *D. salina* при различных удельных скоростях протока и моментах его включения. Подсчитаем, какой урожай можно получить в течение одного месяца при максимальной и минимальной удельных скоростях протока, опираясь на расчётные данные линейной фазы накопительной кривой культуры *D. salina*. Подставим данные из таблицы 2.2 в выражения (2.6), (2.7), (2.8) и (2.9).

При максимальной удельной скорости протока

$$\omega_{max} = \frac{3,59}{18,85} = 0,19 \text{ сут}^{-1}$$

получим в первом случае (проток включён в начале линейного роста в момент времени t_l):

$$Y_{l,\omega=max} = (30 - 0) \cdot 3,59 = 107,7 \text{ г} \cdot \text{м}^{-2};$$

во втором (проток включён в начале линейного роста в момент t^l):

$$Y_{\omega=max}^l = (30 - 7) \cdot 3,59 + (44,08 - 18,85)(1 - e^{0,19(30-7)}) = 107,48 \text{ г} \cdot \text{м}^{-2}.$$

Таблица 2.2: Данные накопительной кривой

Наименование	Значение	Размерность
Продуктивность, P_m	3,59	$\text{г} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сут}^{-1}$
Плотность культуры в начале линейного роста, B_l	18,85	$\text{г} \cdot \text{м}^{-2}$
Плотность культуры в конце линейного роста, B^l	44,08	$\text{г} \cdot \text{м}^{-2}$
Начало линейной фазы роста, t_l	0	сут
Конец линейной фазы роста, t_l	7	сут
Максимальная удельная скорость протока, ω_{max}	0,19	сут^{-1}
Минимальная удельная скорость протока, ω_{min}	0,08	сут^{-1}

Очевидно, значения величины урожая для обоих случаев близки. Различия будут тем больше, чем меньше время культивирования (рис. 2.6).

Аналогично для минимальной величины ω_{min} :

$$\omega_{min} = \frac{3,59}{44,08} = 0,08 \text{ сут}^{-1},$$

при включении протока в момент начала линейного роста t_l урожай составит

$$Y_{l,\omega=min} = (30 - 0) \cdot 3,59 - (44,08 - 18,85) \cdot (1 - e^{0,08(30-0)}) = 84,76 \text{ г} \cdot \text{м}^{-2}.$$

А при включении протока в конце линейного роста —

$$Y_{\omega=min}^l = 23 - 3,59 = 82,57 \text{ г} \cdot \text{м}^{-2}.$$

Таким образом, на основе вышеизложенного можно заключить: чем больше время культивирования (в рамках линейного роста в хемостате), тем меньше величина урожая зависит от момента включения протока, плотности культуры и удельной скорости протока.

Предложенная модель в условиях промышленного производства биомассы *D. salina* позволила разработать следующие рекомендации: для получения максимального урожая при ограниченном времени культивирования необходимо организовать хемостат 1) с максимальной величиной удельной скорости протока (в рамках линейного роста), 2) с включением протока в начале линейной фазы роста.

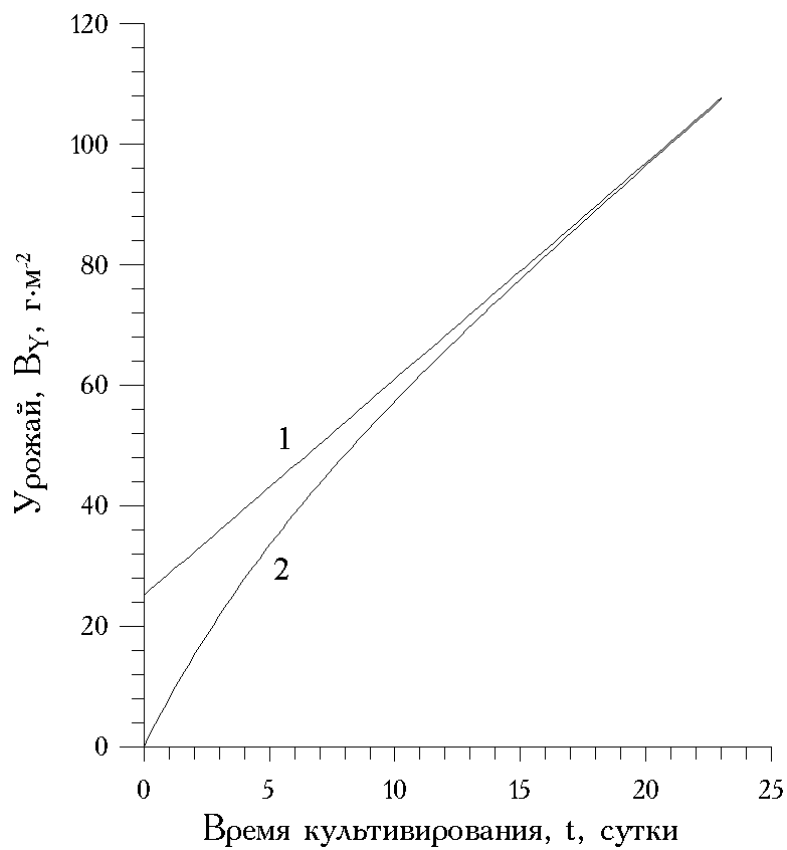


Рис. 2.6. Зависимость величины урожая $D. salina$ (B_Y) от времени культивирования при $\omega = 0,19 \text{ сут}^{-1}$: 1 — проток включён в момент времени t_l , 2 — проток включён в момент времени t^l .

2.2. Динамика концентрации NaCl в культуральной среде

При выращивании *Dunaliella salina* с целью получения β -каротина концентрация NaCl в питательной среде является управляющим фактором каротиногенеза [14]. Уникальная особенность галобных микроводорослей выдерживать повышенную солёность способствовала разработке технологий выращивания *D. salina* в культиваторах открытого типа (озерах, бассейнах), где высокие концентрации NaCl с одной стороны вызывают интенсивный синтез каротинов, с другой — являются ключевым моментом в поддержании альгологической чистоты культуры. Ясно, что в таких условиях непрерывное культивирование требует значительного расхода солей в связи с использованием питательных сред с огромной массовой долей NaCl (среда Артари 116 г/л, Ven-Amotz 60 г/л и др.). Даже при минимальных объёмах производства расход NaCl исчисляется тоннами.

Другая не менее важная проблема производства биомассы *D. salina* заключена в способе отделения биомассы от среды при сборе урожая. Одним из самых простых и распространённых является способ осаждения клеток центрифугированием. Однако при использовании обычных центрифуг — наиболее дешёвого оборудования — в производственных масштабах такой способ связан с большими временными затратами. Поэтому на этом этапе существенную роль играет объём центри-

фугируемой суспензии. Чем меньше этот объём, тем меньше времени потребует этап сепарирования.

С целью регуляции концентрации NaCl в культиваторе посредством изменения удельной скорости протока среды и уменьшения объёма центрифугируемой суспензии без потери биомассы на этапе сбора урожая была разработана простейшая математическая модель оптимизации технологического процесса выращивания *D. salina* в культиваторах открытого типа.

Постановка задачи. Пусть имеется культиватор открытого типа (бассейн) с рабочим объёмом W и суспензией микроводорослей, выращиваемых в непрерывном режиме. За счёт испарения воды, исключая процессы образования «солёного пара», с поверхности суспензии в культиваторе величины удельной скорости протока на входе и на выходе культиватора неодинаковы. Пусть текущая концентрация NaCl в бассейне S_0 , а концентрация в используемой питательной среде S . Предполагая, что заданный компонент питательной среды не потребляется микроводорослями, необходимо найти функцию, описывающую динамику концентрации NaCl в суспензии для хемостата и квазинепрерывной культуры.

Модель. Непрерывный режим культивирования. Рассмотрим культуру микроводорослей в хемостате с удельной скоростью протока $\omega_{\text{пр}}$ и удельной скоростью испарения воды $\omega_{\text{исп}}$. Также введём в рассмотрение следующие величины: m_0 — текущее количество соли в суспензии, г; $m_{\text{выг}}$ — количество соли выносимое с

протоком, г; $m_{\text{пр}}$ — количество соли вносимое с протоком в культиватор, г; $v_{\text{пр}}$ — скорость подачи питательной среды в культиватор, л/сут; $v_{\text{выт}}$ — скорость вытекания суспензии из культиватора, л/сут; $v_{\text{исп}}$ — скорость испарения воды с поверхности суспензии, л/сут. Исключим какие бы то ни было взаимодействия, приводящие к уменьшению величины S_0 за счёт образования нерастворимых осадков, газов и пр. Также будем полагать, что при перемешивании суспензии микродорожей границы растворимости NaCl в суспензии достаточно велики и любые вариации удельной скорости протока заведомо не приведут к выпадению NaCl в осадок.

Закон сохранения объёма и массы представляется в следующем виде:

$$\begin{cases} dV_{\text{пр}} = dV_{\text{выт}} + dV_{\text{исп}} \\ dm_{\text{пр}} = dm_0 + dm_{\text{выт}} \end{cases} \quad (2.10)$$

где

$$\begin{aligned} dV_{\text{пр}} &= v_{\text{пр}} dt, & dV_{\text{исп}} &= v_{\text{исп}} dt, \\ dm_{\text{пр}} &= v_{\text{пр}} S dt, & dm_0 &= W dS_0, & dm_{\text{выт}} &= S_0 dV_{\text{выт}}. \end{aligned} \quad (2.11)$$

Откуда

$$\begin{cases} \frac{dV_{\text{выт}}}{dt} = v_{\text{пр}} - v_{\text{исп}} \\ v_{\text{пр}} S = W \frac{dS_0}{dt} + S_0 \frac{dV_{\text{выт}}}{dt}. \end{cases} \quad (2.12)$$

Решая систему (2.12),

$$v_{\text{пр}} S = W \frac{dS_0}{dt} + (v_{\text{пр}} - v_{\text{исп}}) S_0;$$

$$W \frac{dS_0}{dt} = v_{\text{пр}} S - (v_{\text{пр}} - v_{\text{исп}}) S_0;$$

с учётом $\omega_{\text{пр}} = \frac{v_{\text{пр}}}{W}$, $\omega_{\text{исп}} = \frac{v_{\text{исп}}}{W}$, имеем:

$$\frac{dS_0}{dt} = S \omega_{\text{пр}} - (\omega_{\text{пр}} - \omega_{\text{исп}}) S_0. \quad (2.13)$$

Разделив переменные и задав начальные условия, можно найти интегральное выражение для динамики концентрации NaCl в культиваторе:

$$\frac{dS_0}{\omega_{\text{пр}} S - (\omega_{\text{пр}} - \omega_{\text{исп}}) S_0} = dt;$$

$$\int_{S_{\text{н}}}^{S_0} \frac{dS_0}{\omega_{\text{пр}} S - (\omega_{\text{пр}} - \omega_{\text{исп}}) S_0} = \int_{t_{\text{н}}}^t dt;$$

$$-\frac{1}{\omega_{\text{пр}} - \omega_{\text{исп}}} \cdot \ln \frac{\omega_{\text{пр}} S - (\omega_{\text{пр}} - \omega_{\text{исп}}) S_0}{\omega_{\text{пр}} S - (\omega_{\text{пр}} - \omega_{\text{исп}}) S_{\text{н}}} = (t - t_{\text{н}}),$$

где $S_{\text{н}}$ — концентрация NaCl в начальный момент времени $t_{\text{н}}$.

Или:

$$\frac{\omega_{\text{пр}} S - (\omega_{\text{пр}} - \omega_{\text{исп}}) S_0}{\omega_{\text{пр}} S - (\omega_{\text{пр}} - \omega_{\text{исп}}) S_{\text{н}}} = e^{-(\omega_{\text{пр}} - \omega_{\text{исп}}) \cdot (t - t_{\text{н}})};$$

$$\begin{aligned}
& \omega_{\text{пр}} S - (\omega_{\text{пр}} - \omega_{\text{исп}}) S_0 = \\
& \quad = [\omega_{\text{пр}} S - (\omega_{\text{пр}} - \omega_{\text{исп}}) S_{\text{H}}] \cdot e^{-(\omega_{\text{пр}} - \omega_{\text{исп}})(t - t_{\text{H}})}; \\
S_0(t) & = \frac{\omega_{\text{пр}}}{\omega_{\text{пр}} - \omega_{\text{исп}}} S - \\
& \quad - \left[\frac{\omega_{\text{пр}}}{\omega_{\text{пр}} - \omega_{\text{исп}}} S - S_{\text{H}} \right] \cdot e^{-(\omega_{\text{пр}} - \omega_{\text{исп}})(t - t_{\text{H}})}. \tag{2.14}
\end{aligned}$$

Величина $\omega_{\text{исп}}$ в данном выражении может принимать как положительные, так и отрицательные значения. Отрицательное значение $\omega_{\text{исп}}$ принимает, к примеру, при регулярном распреснении суспензии осадками при выращивании *D. salina* в прудах под открытым небом. Частный случай: при $\omega_{\text{исп}} = 0$ функция (2.14) преобразовывается к виду

$$S_0(t) = S - (S - S_{\text{H}}) e^{-\omega_{\text{пр}}(t - t_{\text{H}})} \tag{2.15}$$

Функция (2.14) имеет предел при $t \rightarrow \infty$:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} S_0(t) = S_0^{st} = \frac{\omega_{\text{пр}}}{\omega_{\text{пр}} - \omega_{\text{исп}}} S.$$

Следовательно, на практике величина S_0 со временем будет стремиться к некоторой величине S_0^{st} (см. рис. 2.7) и достигнет её при установлении стационарного динамического равновесия (причём, равновесие это устойчиво). Отметим также, что величина S_0^{st} никак не зависит от начальных условий S_{H} и t_{H} и определяется только удельными скоростями испарения и протока среды.

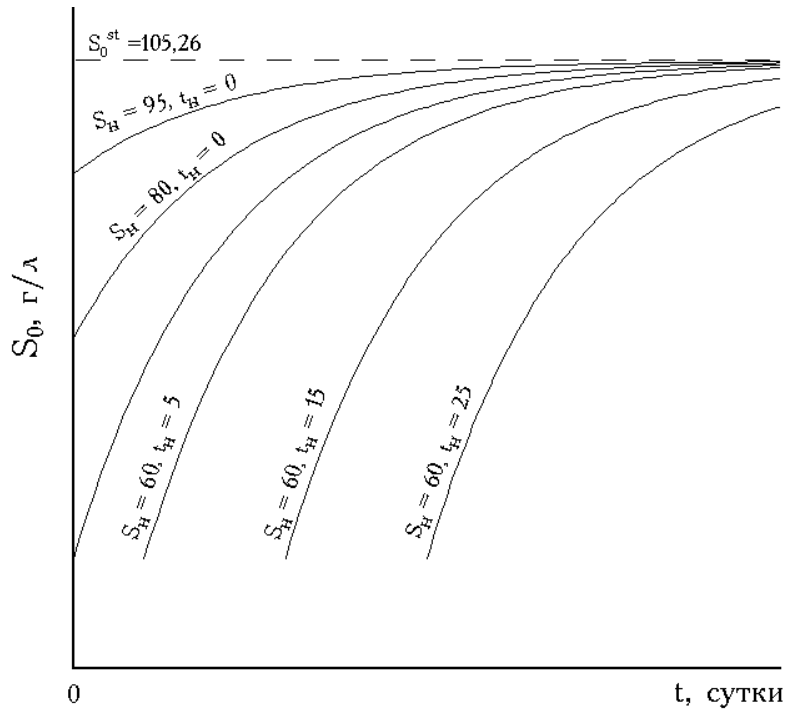


Рис. 2.7. Теоретические кривые динамики концентрации NaCl в культиваторе открытого типа (бассейне) в условиях абсолютно непрерывной культуры (хемостат) при различных начальных условиях S_H, t_H (см. выражение (2.14)), $S = 100, \omega = 0,1$ и $\omega_{исп} = 0,005$.

Квазинепрерывный режим культивирования. В условиях промышленного культивирования микроводорослей на базе тепличных хозяйств с использованием естественного освещения в той или иной мере неизбежным становится периодичность всего технологического процесса. В такой ситуации исключительным является метод квазинепрерывной культуры, который, с одной стороны, в значительной мере упрощает весь технологический процесс производства биомассы, с другой — расширяет возможность управления кинетикой роста и биосинтезом микроводорослей. Достаточно гибко проявляет себя этот метод в контроле и управлении величиной концентрации растворённых солей, в частности NaCl. Из анализа непрерывной культуры ясно, что при испарении воды с поверхности суспензии каждая последующая процедура обмена будет повышать эту величину до тех пор, пока она не достигнет некоторой постоянной S_n^{st} .

Найдем текущую величину концентрации NaCl после первой процедуры обмена S_1 . Итак, за время Δt между процедурами обмена некоторый объём воды $w_{исп}$ испарится. Чтобы сохранить постоянство удельной скорости потока $\omega_{пр}$, необходимо слить объём суспензии с учётом испарения, т.е. после слива в культиваторе должен остаться объём

$$W_c = W - (w - w_{исп}). \quad (2.16)$$

Следовательно, можно записать следующие величины

для концентраций NaCl до и после обмена:

$$S_0 = \frac{m_0}{W}, \quad S_0^{\text{исп}} = \frac{W}{W - w_{\text{исп}}} S_0,$$

$$S_1 = \frac{W_c S_0^{\text{исп}} + (W - W_c) S}{W} = \frac{W_c S_0}{W - w_{\text{исп}}} + \left(1 - \frac{W_c}{W}\right) S,$$

где S_0 — текущая концентрация до обмена без испарения; $S_0^{\text{исп}}$ — текущая концентрация до обмена с учётом испарения; S_1 — текущая концентрация после обмена без испарения.

Аналогичное выражение запишем и для величины S_2 , т. е. после второй процедуры обмена

$$S_2 = \frac{W_c}{W - w_{\text{исп}}} S_1 + \left(1 - \frac{W_c}{W}\right) S = AS_1 + B,$$

где

$$A = \frac{W_c}{W - w_{\text{исп}}}, \quad B = \left(1 - \frac{W_c}{W}\right) S. \quad (2.17)$$

Подставляя выражение для S_1 в выражение для S_2 , получим:

$$S_2 = A(AS_0 + B) + B.$$

И далее, для любого номера процедуры обмена n справедливо

$$S_n = AS_{n-1} + B = A^n S_0 + B (1 + A + A^2 + \dots + A^{n-1}).$$

Нетрудно заметить, что мы имеем дело с рекурсией и суммой геометрической прогрессии. Откуда окончательно запишем S_n для любого n .

$$S_n = A^n S_0 + \frac{A^n - 1}{A - 1} B, \quad A < 1. \quad (2.18)$$

Устремляя n в бесконечность, получим предел:

$$\lim_{n \rightarrow \infty} S_n = S_n^{st} = \frac{B}{1 - A}. \quad (2.19)$$

Следовательно, как и в случае с абсолютно непрерывным протоком среды, величина S_n со временем будет стремиться к некоторой величине S_n^{st} и достигнет её при установлении стационарного динамического равновесия. На рисунке 2.8 представлены теоретические кривые динамики концентрации NaCl в среде при выращивании *D. salina* квазинепрерывным методом.

По определению [30], для квазинепрерывной культуры удельная скорость протока питательной среды ω через культиватор представляется как

$$\omega = \frac{1}{\Delta t} \frac{w}{W}, \quad (2.20)$$

где w — объём замены суспензии питательной средой за промежуток Δt ; W — рабочий объём суспензии.

Аналогичное выражение можно записать для удельной скорости испарения:

$$\omega_{\text{исп}} = \frac{1}{\Delta t} \frac{w_{\text{исп}}}{W}. \quad (2.21)$$

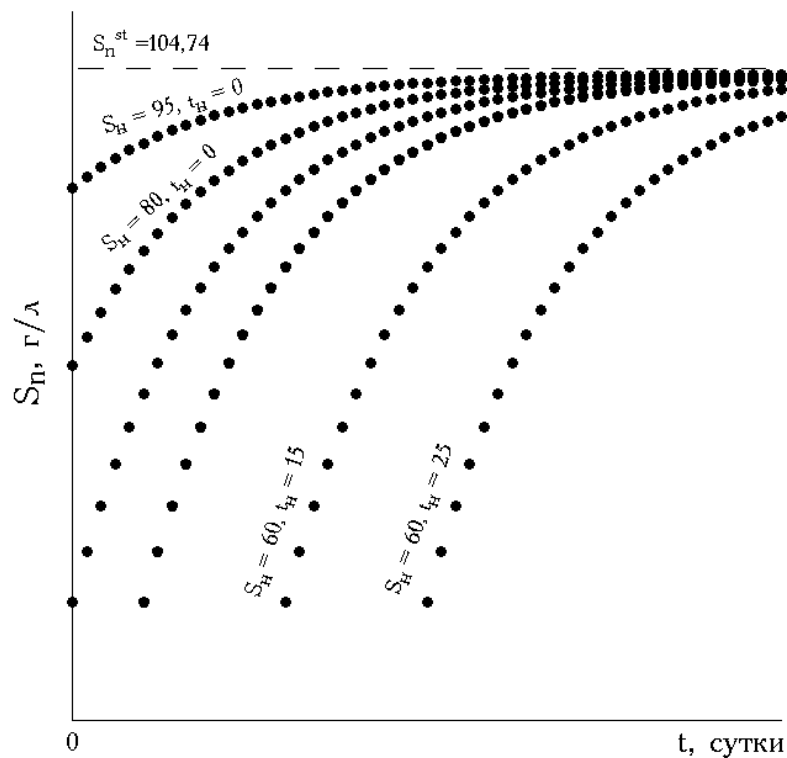


Рис. 2.8. Теоретические кривые динамики концентрации NaCl в культиваторе открытого типа (бассейне) в квазинепрерывной культуре при различных начальных условиях S_H, t_H (см. выражение (2.18), (2.23)), $S = 100$, и $\omega = 0,1$, $\omega_{исп} = 0,005$.

где $w_{\text{исп}}$ — объём испарения за время Δt .

Выражение (2.18) можно записать следующим образом

$$S_n = A^n S_0 + \frac{A^n B}{A-1} - \frac{B}{A-1}$$

или, с учётом (2.19)

$$S_n = A^n (S_0 - S_n^{st}) + S_n^{st}. \quad (2.22)$$

Далее, с учётом (2.20) и (2.21) из (2.16) следует

$$\frac{W_c}{W} = 1 - \frac{w - w_{\text{исп}}}{W} = 1 - \Delta t (\omega - \omega_{\text{исп}}).$$

Отсюда

$$A = \frac{W_c}{W - w_{\text{исп}}} = \frac{W_c}{W - W \Delta t \omega_{\text{исп}}} = \frac{1 - \Delta t (\omega - \omega_{\text{исп}})}{1 - \Delta t \omega_{\text{исп}}}.$$

Подставляя полученный результат в (2.22), окончательно имеем

$$S_n = \left[\frac{1 - \Delta t (\omega - \omega_{\text{исп}})}{1 - \Delta t \omega_{\text{исп}}} \right]^n (S_0 - S_n^{st}) + S_n^{st}. \quad (2.23)$$

Итак, теоретический анализ показал, что как и в случае абсолютно непрерывной, так и в квазинепрерывной культуре *Dunaliella salina* при постоянстве концентрации NaCl в подаваемой в культиватор питательной среде, концентрация NaCl в культуральной среде будет

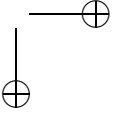
стремиться к некоторой постоянной S^{st} . Также анализ разработанной модели показал, что знание величины удельной скорости испарения воды с поверхности бассейна позволит легко добиться поддержания заданного значения солёности культуральной среды с помощью изменения величины удельной скорости протока питательной среды.



Заключение

Управление процессом культивирования *Dunaliella salina* в промышленных масштабах с целью достижения максимальной продуктивности по биомассе или по какому-либо биохимическому показателю биомассы (например, β -каротину) по-прежнему остаётся достаточно сложной задачей, несмотря на многолетние исследования в данной области. Наш опыт показывает, что на производстве особое внимание необходимо уделить следующим вопросам: 1. Выбору соответствующего требованиям производства штамма *D. salina*, например, для продукции β -каротина на основе результатов проведённых экспериментов можно утверждать, что наиболее подходящим является IBSS-2 из коллекции Ланской (ИнБЮМ). 2. Выбору питательной среды для культивирования. Наиболее оптимальным вариантом является модифицированная¹ среда Ven-Amotz (см. стр. 50). 3. Поддержание альгологической чистоты культуры *D. salina*. Для этого следует концентрацию NaCl в среде всегда поддерживать на уровне 120 г/л. И, наконец, 4. Особое внимание следует уделить выбору

¹Модификация заключается в добавлении 120 г/л NaCl вместо 60.

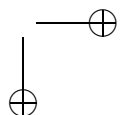
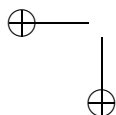


метода культивирования. Для *D. salina* наиболее приемлемым оказался метод непропорционально-проточной культуры, который позволяет решить целый ряд задач технологического характера.



Список литературы

1. Абдуллаев А. А., Семенов В. Е. Интенсивная культура *Dunaliella salina* Теод. и некоторые её физиологические характеристики // *Физиология растений*. — 1974. — Т. 21. — С. 1145–1153.
2. Бакланов А. Н., Чмиленко Ф. А. Получение β -каротина (обзор) // *Экотехнологии и ресурсосбережение*. — 2000. — № 4. — С. 32–35.
3. Белянин В. Н., Сидько Ф. Я., Тренкеншу А. П. Энергетика фотосинтезирующей культуры микроводорослей / Под ред. Б. Г. Коврова. — Новосибирск: Наука. СО, 1980. — 126 с.
4. Божков А. И., Комаристая В. П. Липидно-каротиноидный обмен в клетках *Dunaliella salina* Теод. при различных условиях культивирования // *Альгология*. — 2003. — Т. 13, № 2. — С. 137–147.
5. Владимирова М. Г. Ультраструктурная организация клетки *Dunaliella salina* и её функциональные изменения в зависимости от интенсивности света и



- температури // *Физиология растений*. — 1978. — Т. 25. — С. 571–576.
6. Владимирова М. Г., Семененко В. Е. Интенсивная культура одноклеточных водорослей (инструкция по первичным испытаниям, выделяемых из природы и селекционируемых форм фотоавтотрофных одноклеточных водорослей) / Под ред. А. А. Ничипоровича. — М.: АН СССР, 1962. — 60 с.
 7. Геворгиз Р. Г., Боровков А. Б. Динамика биомассы *Dunaliella salina* в условиях непрерывного культивирования // *Экология моря*. — 2005. — Т. 67. — С. 35–37.
 8. Дивавин И. А., Копытов Ю. П. Динамика изменений биохимического состава отдельных органов мидии *Mytilus galoprovincialis* при интоксикации соляром // *Экология моря*. — 1988. — Т. 26. — С. 80–86.
 9. Дрокова И. Г., Кузнецов М. В., Попова Р. Ц. Вміст каротину у водорості *Dunaliella salina* Теод. при вирощуванні на рапі в лабораторних умовах // *ДАН УРСР. Сер. Б.* — 1967. — Т. 8. — С. 736–739.
 10. Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР. — М: ИФР РАН, 1991. — 226 с.
 11. К физиологической характеристике *Chlorella* sp. при высоких экстремальных температурах. II. Изменение

- биосинтеза, ультраструктуры и активности фотосинтетического аппарата хлореллы при разобщении клеточных функций экстремальной температурой / В. Е. Семененко, М. Г. Владимирова, О.Б. Орлеанский, и др. // *Физиология растений*. — 1969. — Т. 16. — С. 210–220.
12. Масюк Н. П. Вплив йонів Na, Mg, Cl та SO_4 на ріст, розмноження та каротиноутворення водорості *Dunaliella salina* Teod. // *Укр. бот. журн.* — 1965. — Т. 22, № 5. — С. 3–9.
13. Масюк Н. П. Масова культура каротиноносної водорості *Dunaliella salina* teod. // *Укр. бот. журн.* — 1966. — Т. 23, № 2. — С. 12–18.
14. Масюк Н. П. Морфология, систематика, экология, географическое распределение рода *Dunaliella* Teod. и перспективы практического использования. — К.: Наук. думка, 1973. — 244 с.
15. Масюк Н. П., Радченко М. И. Количественное содержание пигментов в клетках некоторых видов *Dunaliella salina* Teod. в условиях благоприятных для размножения // *Гидробиол. журн.* — 1971. — Т. 7, № 6. — С. 31–40.
16. Масюк Н. П., Юрченко В. В. Вплив концентрації водневих йонів на водорість *Dunaliella salina* Teod. // *Укр. бот. журн.* — 1962. — Т. 19, № 4. — С. 91–94.

17. Милько Е. С. Изучение потребностей двух видов водорослей в минеральных и органических компонентах среды // *Вестник МГУ*. — 1962. — № 1. — С. 18–24.
18. Милько Е. С. Изучение физиологии и пигментобразования зелёной водоросли *Dunaliella*: Автореф. дисс. . . канд. биол. наук. — 1963. — 18 с.
19. Миронюк В. И., Масюк Н. П., Сапура О. В. Осмотическое давление в клетках некоторых олиго- и гипергалобных водорослей и в окружающей их среде // *Гидробиол. журн.* — 1984. — № 1. — С. 46–49.
20. Миронюк В. И., Эйно́р Л. О. Цитохромоксидаза *Dunaliella salina* Теод. // *Укр. бот. журн.* — 1969. — Т. 26, № 6. — С. 88–98.
21. Миронюк В. И., Эйно́р Л. О. Вивчення кінетики кисневого обміну одноклітинної водорості *Dunaliella salina* Теод. // Матеріали 4-ої наукової конференції молодих вчених Ін-ту гідробіології АН УРСР. — 1972. — С. 95–99.
22. Посудин Ю. И., Масюк Н. П., Лилицкая Г. Г. Влияние ультрафиолетового излучения на фотодвижение двух видов *Dunaliella* Теод. // *Альгология*. — 2004. — Т. 14, № 2. — С. 113–126.

23. Работнова И. Л., Милько Е. С. Влияние условий культивирования на образование каротина водорослью *Dunaliella salina* // Биология автотрофных микроорганизмов. — М.: Изд-во МГУ, 1966. — С. 165.
24. Семененко В. Е. Внутриклеточная регуляция и управление биосинтезом микроводорослей: Автореф. дисс. . . докт. биол. наук. — М, 1975. — 24 с.
25. Семененко В. Е., Абдуллаев А. А. Параметрическое управление биосинтезом β -каротина в клетках *Dunaliella salina* в условиях интенсивной культуры // Физиология растений. — 1980. — Т. 27, № 1. — С. 31–41.
26. Семененко В. Е., Афанасьева В. П. К изучению механизмов авторегуляции фотосинтеза. Обратимый 2-дезоксид- D -глюкозный эффект репрессии фотосинтетического аппарата клетки *Chlorella* // Физиология растений. — 1972. — Т. 19, № 5. — С. 1074–1081.
27. Семененко В. Е., Рудова Т. С. Влияние циклогексимида на процесс перестройки биосинтеза клеток хлореллы, вызываемый азотным голоданием // Физиология растений. — 1975. — Т. 22, № 5. — С. 958–964.
28. Сравнительная характеристика роста и направленности биосинтеза различных штаммов хлореллы в

- условиях азотого голодания. - II. Образование углеводов и липидов / Т. С. Жукова, Г. Л. Клячко-Гурвич, М. Г. Владимирова, Т. А. Курносова // *Физиология растений*. — 1969. — Т. 16, № 96. — С. 210–220.
29. Тренкеншу Р. П. Ростовые и фотоэнергетические характеристики морских микроводорослей в плотной культуре: Дисс. . . канд. биол. наук / ИФ СО. — Красноярск, 1984. — С. 137.
30. Тренкеншу Р. П. Простейшие модели роста микроводорослей 1. Периодическая культура // *Экология моря*. — 2005. — Т. 67. — С. 89–97.
31. Тренкеншу Р. П. Простейшие модели роста микроводорослей 2. квазинепрерывная культура // *Экология моря*. — 2005. — Т. 67. — С. 98–110.
32. Тренкеншу Р. П., Беянин В. Н. Влияние элементов минерального питания на продуктивность водоросли *Platymonas viridis* Rouch. // *Биология моря*. — 1979. — Т. 51, № 51. — С. 41–46.
33. Уильямсон М. Анализ биологических популяций. — М.: Мир, 1975. — 271 с.
34. Упитис В. В. Макро- и микроэлементы в оптимизации минерального питания микроводорослей. — Рига: Зинатне, 1983. — 320 с.

35. Юрина Е. В. Опыт культивирования галобионтных водорослей *Asteromonas gracilis* Artari и *Dunaliella salina* Теод. // *Вестник МГУ*. — 1966. — Т. 6. — С. 76–83.
36. Algal culturing techniques / Ed. by R. A. Andersen. — Burlington: Academic Press, 2005. — 570 pp.
37. Borowitzka M.A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters // *J. Biotechnol.* — 1999. — Vol. 70. — Pp. 313–321.
38. Conditions for open-air outdoor culture of *Dunaliella salina* in southern Spain / M. Garcia-González, J. Moreno, J. P. Cañavate, et al. // *J. Appl. Phycol.* — 2003. — Vol. 15. — Pp. 177–184.
39. Duerr E. O., Molnar A., Sato V. Cultured microalgae as aquaculture feeds // *J Mar Biotechnol.* — 1998. — Pp. 65–70.
40. Lee Yuan-Kun. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential // *J. Appl. Phycol.* — 2001. — Vol. 13. — Pp. 307–315.
41. Loeblich L. A. Growth limitation of *Dunaliella salina* by CO₂ at high salinity // *J. Phycol.* — 1970. — Vol. 6, no. 9. — Pp. 9–14.
42. McLachlan J. The growth of unicellular algae in artificial and enriched sea water media // *Canad. J. Microbiol.* — 1959. — Vol. 5, no. 1. — P. 9–15.

43. *McLachlan J.* The culture of *Dunaliella tertiolecta* Buther — an euryhaline organism // *Canad. J. Microbiol.* — 1960. — Vol. 6, no. 3. — P. 367–379.
44. *Provasoli L., Pintner I.* Ecological implications on in vitro nutritional requirements of algae flagellates // *Ann. N. Y. Acad. Sc.* — 1953. — Vol. 56, no. 5. — P. 839–851.
45. *Richmond A.* Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: A personal view // *J. Appl. Phycol.* — 2000. — Vol. 12. — Pp. 441–451.
46. *Rowan K. S.* Photosynthetic pigments of algae. — New York: Cambridge etc.: Cambridge Univer. Press., 1989. — 266 pp.
47. *Ryther J. H.* Interrelation between photosynthesis and respiration in the marine flagellate *Dunaliella euchlorra* // *Nature.* — 1956. — Vol. 178. — Pp. 861–863.
48. Scale-up of tubular photobioreactors / E. M. Grima, F. F. G. Acien, Garcā C. F. et al. // *J. Appl. Phycol.* — 2000. — Vol. 12. — Pp. 355–368.
49. *Shaish A., Avron M., Ben-Amotz A.* Effect of inhibitors on the formation of stereoisomers in the biosynthesis of β -carotene in *Dunaliella bardawil* // *Plant. Cell. Physiol.* — 1990. — Vol. 31, no. 5. — Pp. 689–696.

Оглавление

Введение	3
1. <i>Dunaliella salina</i> Теод. как объект биотехнологии	6
1.1. Зелёная микроводоросль <i>Dunaliella salina</i> .	6
1.2. Особенности интенсивного культивирования <i>Dunaliella salina</i>	29
1.3. IBSS-2 — перспективный штамм для промышленного культивирования	38
1.4. Рост <i>Dunaliella salina</i> в смешанной культуре	48
2. Оптимизация процессов культивирования <i>Dunaliella salina</i>	60
2.1. Оптимизация времени включения потока и величины удельной скорости потока	60
2.2. Динамика концентрации NaCl в культуральной среде	80
Заключение	92



R. P. Trenkenshu, R. G. Gevorgiz, A. B. Borovkov

The fundamentals of industrial cultivation of *Dunaliella salina* Teod. — Sevastopol: ECOSI–Hydrophisica, 2005. — 103 p.

The results of investigations of *Dunaliella salina* Teod. production characteristics provided at industrial conditions have been presented in this book. The attention has been shared out to the questions of cultivation processes optimization, biology and biochemistry of green microalgae *D. salina*.

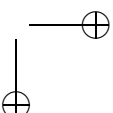
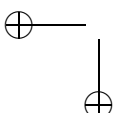
Monograph presents interest for the biology specialists also it will be useful for the postgraduate students and students.

Тренкеншу Р. П., Геворгиз Р. Г., Боровков А. Б.

Основи промислового культивування Дуналієлли солонowodной (*Dunaliella salina* Теод.). — Севастополь: ЭКОСИ–Гідрофізика, 2005. — 103 с.

У монографії представлено результати досліджень продукційних характеристик *Dunaliella salina* Теод., які проводились у виробничих умовах. Приділено увагу питанням оптимізації процесу культивування, біології та біохімії зеленої мікрowodорості *D. salina*.

Монографія становить інтерес для фахівців-біотехнологів. Також буде корисна аспірантам відповідних спеціальностей і студентам вищих навчальних закладів.



Рудольф Павлович Тренкеншу,

заведующий отделом биотехнологий и фиторесурсов.

Геворгиз Руслан Георгиевич,

научный сотрудник отдела биотехнологий и фиторесурсов.

Боровков Андрей Борисович,

младший научный сотрудник отдела биотехнологий и фиторесурсов

Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского

пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, Крым

E-mail: trenkens@yandex.ru <http://biotex.ibss.org.ua>

Телефон: (+038)(0692)55-07-95

Оригинал-макет подготовил Р. Г. Геворгиз в пакете $\text{\LaTeX} 2_{\epsilon}$ с использованием кириллических шрифтов А. Лебедева PSCyr (v0.4c).

Сдано в набор 30.11.2005. Подписано к печати 27.12.2005

Печать офсетная. Формат $70 \times 108^{1/16}$. Гарнитура академическая.
Объем: печатных листов —. Уч.-изд.л. —. Тираж — экз. Заказ —.

НПЦ «ЭКОСИ-Гидрофизика», 99005 Севастополь, ул. Ленина, 28. Свидетельство о государственной регистрации: серия ДК №914 от 16.02.02 г.