

ДИНАМИКА БЕЛКА В НЕПРЕРЫВНОЙ КУЛЬТУРЕ *TETRASELMIS VIRIDIS*

Новикова Т.М., Тренкеншу Р.П.

Севастопольский государственный университет
ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ
e-mail: nowtanj@yandex.ruИнститут морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского, РАН
пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ

Аннотация. В работе представлено исследование динамики содержания белка в непрерывной культуре зеленой микроводоросли *Tetraselmis viridis* при различных режимах плотностата. Сделаны предположения о влиянии исследуемого режима на содержание белка в культуре для каждого динамически равновесного состояния. Эмпирически определена зависимость динамика содержания белка в культуре микроводоросли от плотности культуры в непрерывном режиме.

Ключевые слова: микроводоросли, белок, непрерывный режим, *Tetraselmis viridis*.

DYNAMICS OF PROTEINS IN THE CONTINUOUS CULTURE *TETRASELMIS VIRIDIS*

Novikova T.M., Trenkenshu R. P.

Sevastopol State University
Universitetskaya St., 33, Sevastopol, 299053, Russia
e-mail: nowtanj@yandex.ruA.O. Kovalevsky Institute of Marine Biological Research of RAS
Nakhimov av., 2, Sevastopol, 299011, Russia

Abstract . The paper presents a study protein of dynamics of continuous culture in green microalgae *Tetraselmis viridis* under different modes culture density. Assumptions are made about the influence of the test mode on the protein content of the culture for each dynamic equilibrium The empirically is defined dependent of protein dynamics in the culture of microalgae culture density continuously.

Key words: microalgae, protein, the continuous culture, *Tetraselmis viridis*.

Исследованием микроводорослей занимаются очень давно. Фотосинтезирующие организмы характеризуются высокой эффективностью преобразования солнечной энергии, а также способность адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды и неблагоприятным внешним воздействиям. Это обеспечивается за счет регуляции интенсивности фотосинтеза на различных уровнях: генетическом, метаболическом, морфологическом, структурном и некоторых других. В связи с тем, что фотосинтез является начальным звеном сложной и разветвленной последовательности реакций метаболизма, обеспечивающим в конечном итоге рост и развитие растений в соответствии с генетической программой, все уровни его регуляции интенсивно изучаются как с целью получения фундаментальных знаний, так и в связи с решением широкого спектра самых насущных прикладных задач [1]. На сегодня это самые разнообразные направления, это и использование биомассы в натуральном виде в качестве биодобавки как для человека, так и для животных, это и применение различных биохимических компонентов клеток в медицине, косметологии, военной промышленности, космосе и др. На сегодняшний день микроводоросли являются особенно привлекательным объектом в инновационной сфере «зеленая химия», благодаря таким свойствам как прототрофность, способность к фотосинтезу, неприхотливости к условиям культивирования, способности к росту с высоким выходом биомассы. В микроводорослях содержание белка может достигать до 70%, они содержат все незаменимые аминокислоты – треонин, валин, фенилаланин, лейцин, изолейцин, лизин, метионин и др. Данные ВОЗ свидетельствуют о том, что более 60 % человечества питается неудовлетворительно, не получая достаточного количества белковой пищи. Разрешить эту проблему могут микроскопические водоросли, так как в них содержится большое количество полноценных белков, необходимых для человека. Проводя анализы по обнаружению микроэлементов которыми насыщают микроводоросли было найдено что они прикрепляются к белковым структурам.

Основная задача данного исследования получить культуру со стабильным содержанием белка в условиях непрерывной культуры микроводоросли.

Материалы и методы.

Культура *Tetraselmis viridis* была получена из коллекции Института морских биологических исследований. *T. viridis* выращивали в унифицированной установке для культивирования микроводорослей на среде «Тренкеншу», растворяя в 1 л морской воды следующие вещества: $\text{NaNO}_3 - 1,8 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O} - 0,3 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$; $\text{Na}_2\text{EDTA} - 0,037 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$; $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 7 \text{ H}_2\text{O} - 0,042 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$; $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O} - 0,008 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O} - 0,00625 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{ H}_2\text{O} - 0,00183 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$; $\text{K}_2\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_2 \times 24 \text{ H}_2\text{O} - 0,00238 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$;

Лабораторная установка для культивирования состояла из установочной площадки, двух фотобиореакторов, системы освещения, термостабилизации, газообеспечения, а также системы обеспечения непрерывного режима культивирования. Фотобиореактор представлял собой емкость из стекла размером 400×200×50 (плоскопараллельный тип) с рабочей толщиной 50 мм, рабочий объем реактора – 3 л. В качестве источника света использовалась горизонтальная световая решетка, состоящая из 10 ламп дневного света General Electric F18W/54-

765. Фотобиореакторы располагались в плотную к лампам, средняя освещённость на поверхности обоих реакторов была одинаковой и составляла около 19 кЛк. Барботаж культуры осуществляли аквариумным компрессором типа CR-40R с двумя выходами (для двух фотобиореакторов), производительностью 3 л/мин и максимальным давлением 0,022 МПа. Скорость подачи воздуха была установлена на уровне 1 л на литр культуры в минуту. Значение температуры составляло 28 ± 2 °С. В процессе выращивания культуру непрерывно барботировали газо-воздушной смесью с 3 % по объёму углекислого газа с помощью компрессорной установки.

В экспериментах проводили измерение температуры, pH, оптической плотности суспензии. Перед проведением измерений в фотобиореакторы добавляли дистиллированную воду с целью компенсации испарения воды. Температуру суспензии измеряли ртутным термометром непосредственно в культиваторе, абсолютная погрешность измерений составляла $\pm 0,5$ °С. Освещённость поверхности фотобиореактора определяли люксметром Ю-116. Оптическую плотность рассчитывали по формуле: $D = -\lg(T)$, где T – величина пропускания, определяемая на КФК-2 при длине волны 750 нм, абсолютная погрешность при измерении величины пропускания не превышала 1 %. Зольность культуры *T. viridis* составила 21 % от абсолютно сухой массы. При пересчёте единиц оптической плотности к органическому веществу (ОВ) использовали эмпирически определённый коэффициент 0,8.

При определении содержания общего белка культура была переведена в плотностатный режим культивирования [2], причем стационарные плотности были заданы от 0,4 до 1 г·л⁻¹. После того как культура адаптировалась к каждой плотности и наступало состояние стационарного динамического равновесия, проводился отбор проб для определения белков методом Лоури [3].

Результаты и обсуждения.

При накопительном режиме культивирования биохимический состав клеток микроводорослей постоянно изменяется из-за роста культуры и изменения условий среды. Например, уменьшается количество падающей энергии на клетку, снижается обеспеченность минеральным питанием. Все эти факторы в результате оказывают влияние на процессы, происходящие в клетках, что приводит к изменению содержания биохимических компонентов [4]. Непрерывный режим культивирования микроводорослей, а именно плотностат, характеризуется постоянством плотности культуры, скорости роста и условий среды. В работе проведена серия экспериментов в квазинепрерывном режиме культивирования, характеризующийся тем что задается вначале суток плотность культуры, например, 0,4 г·л⁻¹ и через 24 часа измеряется плотность культуры в конце суток. Период времени между разбавлениями устанавливается, в зависимости от относительной скорости прироста культуры. Промежуток времени между разбавлениями – сутки, коэффициент разбавления подбирался таким образом, чтобы плотность после разбавления достигла заданной величины [2]. Такие системы позволяют стабилизировать не только световое питание клеток, но и стабилизировать уровень их минерального питания, вплоть до их полного обеспечения энергией и элементами, и достигать максимальных значений скорости роста, ограниченных только внутренними видоспецифическими свойствами [5]. Данную процедуру повторяют до тех пор, пока суточный прирост культуры не становится постоянным. После того как культура микроводорослей по сухому весу ежедневно имела одинаковый прирост, проводили определение содержания белка в культуре *T. viridis*. Выше изложенная процедура повторяется для всех задаваемых начальных плотностей непрерывного режима выращивания микроводоросли *T. viridis*. Используемая среда для культивирования организмов рассчитана на получения плотности культуры до 5 г·л⁻¹, отсюда следует что рост водорослей в выбранном нами диапазоне плотностей не может быть лимитирован минеральным питанием. Это подтверждается тем, что продуктивность культуры для всех равновесных состояний была одинаковой и составляла 0,2 г·л⁻¹·сут⁻¹. В результате для первой стационарной плотности, когда нижняя граница плотности культуры задавалась 0,4 г·л⁻¹ содержание белка изменялось от 0,24 г·л⁻¹ до 0,26 г·л⁻¹. Для второго равновесного состояния, нижняя плотность культуры задавалась 0,5 г·л⁻¹ и содержание белка для данной плотности составляло от 0,27 до 0,28 г·л⁻¹. И аналогично для остальных вариантов опыта вплоть до равновесной плотности культуры 1,0 г·л⁻¹, при которой содержание белка составляло 0,36-0,37 г·л⁻¹. Таким образом, в то время, когда ростовые характеристики достигают стационарного динамического равновесия, содержание белка в культуре еще изменяется и достигает постоянных значений в нашем случае только через трое суток (см. рис. 1).

Можно предположить, что запаздывание выхода в стационарное динамическое равновесие содержания белка по сравнению с плотностью культуры в непрерывном режиме выращивания связано с так называемым принципом «узкого места». Гетерогенный характер организации биологических и биохимических процессов проявляется как в структурном, так и в динамическом отношении. Различные функциональные процессы, отдельные метаболические циклы сильно отличаются друг от друга по их характерным временам и скоростям. Даже в пределах одной отдельной цепи взаимосвязанных реакций всегда имеются наиболее медленные и наиболее быстрые стадии. Поэтому сложные биологические процессы хотя и включают большое число промежуточных звеньев, динамические свойства определяются отдельными наиболее медленными звеньями. [6]. Можно предположить, что «узким местом» метаболизма *T. viridis* в эксперименте являются процессы биосинтеза белка. И наглядно переходные процессы изменений метаболических процессов клеток микроводоросли проявляются через изменение содержания белка при смене режима культивирования, что представлено на рисунке 1. Зависимость содержания белка в культуре *T. viridis* от плотности представлена на рисунке 2. Можно заметить, что с ростом плотности культуры содержание белка увеличивается не линейно.

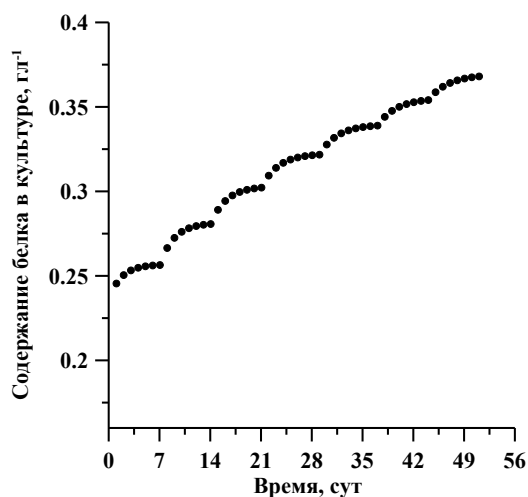


Рисунок 1 – Динамика содержания белка в культуре *Tetraselmis viridis* при непрерывном культивировании (расчетные данные)

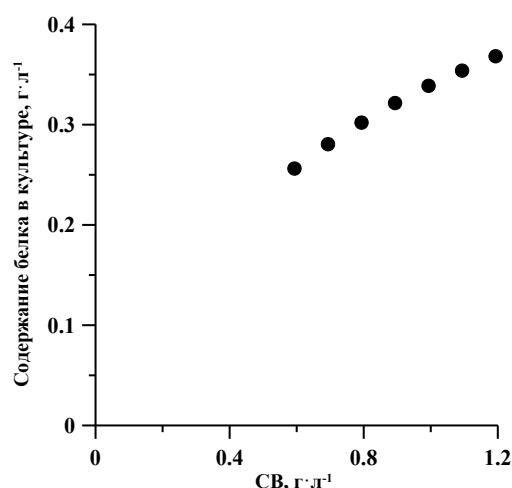


Рисунок 2 – Динамика содержания белка от плотности культуры в непрерывной культуре (экспериментальные данные)

Таким образом, экспериментально выявлена динамика содержания белка в непрерывной культуре *T. viridis* при смене режимов выращивания. Установлена эмпирическая зависимость между содержанием белка в культуре и плотностью непрерывной культуры *T. viridis*.

Список литературы / References:

1. Заворуева Е.Н., Заворуев В.В., Крум С.П. *Лабильность первой фотосистемы фототрофов в различных условиях окружающей среды*: монография. Красноярск: Сибирский федеральный университет, 2011, 152 с. [Zavorueva E.N., Zavoruev V.V., Krym S.P., *The lability first photosystem phototrophic in different environments: a monograph*. Krasnoyarsk: Siberian Federal University, 2011, 152 p. (In Russ.)]
2. Тренкеншу Р.П. Простейшие модели роста микроводорослей 2. Квазинепрерывная культура. *Экология моря*, 2005, вып. 67, с. 98-110. [Trenkenshu R.P. The simplest models of microalgae growth 2. Quasyccontinuous culture. *Sea Ecology*, 2005, vol. 67, pp. 98-110. (In Russ.)]
3. Копытов Ю.Р., Лелеков А.С., Геворгиз Р.Г., Некхоросhev М.В., Новикова Т.М. The method of complex determining of biochemical composition of microalgae. *International Journal on Algae*, 2015, vol. 17, pp. 397-402.
4. Ризниченко Г.Ю. Математические модели первичных процессов фотосинтеза. *Итоги науки и техники ВИНТИ, серия «Биофизика»*, 1991, с. 160. [Riznichenko G.Yu. Mathematical model of primary photosynthetic processes. *Results of Science and Technology VINITI, a series of "Biophysics"*, 1991. p. 160. (In Russ.)]
5. Тренкеншу Р.П. Простейшие модели роста микроводорослей 6. Предельные скорости роста. *Экология моря*, 2010, спец. вып. 80, с. 85-91. [Trenkenshu R.P. The simplest models of microalgae growth 6. Limits of growth rate. *Sea Ecology*, 2010, spec. vol. 80, pp. 85-91. (In Russ.)]
6. Рубин А.Б. Кинетика биологических процессов. *Соросовский образовательный журнал*, 1998, № 10, с. 84-91. [Rubin A.B. Kinetics of biological processes. *Soros Educational Journal*, 1998, no. 10, pp. 84-91. (In Russ.)]

ПРОТОЧНЫЙ ДАТЧИК ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ КУЛЬТУРЫ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Гаврилов П.Е., Азаров А.А., Лелеков А.С.

ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ

e-mail: havrilovpyotr@gmail.com

Аннотация. Определение оптической плотности – один из основных экспресс-методов определения биомассы культуры микроводорослей. Для этого широко используется метод спектрофотометрии. Этот процесс требует непосредственного отбора культуры, разведение пробы до нужной концентрации и замера оптической плотности. Был разработан проточный датчик оптической плотности, способный работать непосредственно с фотобиореактором в проточной культуре. Данный датчик не требует разбавления культуры и может работать без вмешательства извне. Основная задача датчика – измерение оптической плотности культуры на всех стадиях роста и возможность в дальнейшем подключения программного модуля, способного считывать данные с датчика с заданным интервалом времени и вести их цифровую запись.

Ключевые слова. Микроводоросли, спектрофотометрия, светодиод, рассеяние света.