

Список литературы:

1. Garde J.J., Olmo A., Soler A.J., Espeso G., Roldan E.R.S., Gomendio M. Effect of egg yolk, cryoprotectant, and various sugars on semen cryopreservation in endangered Cuvier's gazelle (*Gazella cuvieri*). *Animal Reproduction Science*, 2008, no. 108, pp. 384-401.
2. Salmani H., Towhidi A., Zhandi M., Bahreini M., Sharafi M. In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. *Cryobiology*, 2014, no. 68, pp. 276-280.
3. Yildiz C., Bozkurt Y., Yavas I. An evaluation of soybean lecithin as an alternative to avian egg yolk in the cryopreservation of fish sperm. *Cryobiology*, 2013, no. 67, pp. 91-94.

ПРОМЫШЛЕННАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОМАССЫ МОРСКОЙ ДИАТОМЕИ *CYLINDROTHECA CLOSTERIUM* (EHRENBERG) REIMANN & LEWIN С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГАЗОВИХРЕВОГО ФОТОБИОРЕАКТОРА

Геворгиз Р.Г.¹, Железнова С.Н.¹, Зозуля Ю.В.², Уваров И.П.², Репков А.П.², Лелеков А.С.¹

¹ ФГБУН Институт морских биологических исследований им. А.О.Ковалевского РАН

пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ

e-mail: r.gevorgiz@yandex.ru

² ООО «МикроБиоТехнологии»

ул. Демакова, 30, Новосибирская обл., Советский район (Академгородок), 630128, Россия

e-mail: microbiotex@mail.ru

Аннотация. В работе использовали газовихревой фотобиореактор, который разработан на основе новых принципов перемешивания суспензии микроводорослей. Рабочий объём суспензии в фотобиореакторе составлял 580 л, рабочий слой — 0,08 м, освещаемая поверхность — 7,3 кв.м. В качестве источника освещения использовались лампы ДРЛ-700, которые давали среднюю освещённость на поверхности культуры 7,1 клк (≈30 Вт/кв.м). Максимальная продуктивность интенсивной культуры *C. closterium*, которую выращивали на среде RS, в промышленном фотобиореакторе достигала 1,2 г.сух.массы/л (или 95 г.сух.массы/(сут*кв.м)), что в 3-4 раза превышает показатели других систем культивирования. При сборе урожая сгущали суспензию за счет естественного свойства бентосных диатомей оседать на дно. После сгущения биомассу *C. closterium* фильтровали через ткань. Процедуры осаждения и фильтрования биомассы затраты электроэнергии не потребовали. За 15 дней культивирования получено 3.5 кг сухой биомассы. Таким образом, впервые разработана промышленная технология производства биомассы бентосно-планктонной морской диатомеи *C. closterium* с использованием газовихревого фотобиореактора.

Ключевые слова: биомасса, плотная культура, интенсивная культура

INDUSTRIAL PRODUCTION TECHNOLOGY BIOMASS MARINE DIATOMS *CYLINDROTHECA CLOSTERIUM* (EHRENBERG) REIMANN & LEWIN USING GAS VORTEX PHOTOBIOREACTOR

Gevorgiz R.G.¹, Zheleznova S.N.¹, Zozulya Y.V.², Uvarov I.P.², Repkov A.P.², Lelekov A.S.¹

¹ A.O. Kovalevsky Institute of Marine Biological Research of RAS

Nakhimov Av., 2, Sevastopol, 299011, Russia

e-mail: r.gevorgiz@yandex.ru

² «MicroBioTechnology», Novosibirsk.

e-mail: microbiotex@mail.ru

Abstract. The gas vortex photobioreactor, which is based on new concepts of agitation a microalgae suspension was used. Working volume of suspension in photobioreactor is 580 liters, the working layer - 0.08 m, the illuminated surface - 7.3 sq.m. As a light source used lamps DRL-700, which gave the average illuminance on the surface of culture 7.1 klx (≈30 W / m²). Maximum productivity of *C. Closterium* intensive culture, which is grown in RS media, in an industrial photobioreactor reached 1.2 g. of dry.mass / L (or 95 g. dry weight/(day*sq.m)), which is 3- 4 times higher than in other culture systems. At harvest suspension is concentrated of due to the natural properties of the benthic diatoms to sink to the bottom. After concentrating the biomass of *C. closterium* is filtered through a cloth. Procedures for settling and filtration of biomass electricity costs are not required. During the 15 days of culture 3.5 kg of dry biomass was produced. Thus, the first commercial biomass production technology benthic-planktonic marine diatom *C. closterium* is developed with the use of gas-vortex photobioreactor.

Key words: biomass, a dense culture, intensive culture

Современная наука насчитывает более 30000 видов микроводорослей. Каждый вид обладает своими уникальными особенностями метаболизма и биохимического состава, что дает неограниченные возможности в создании новых биотехнологий производства как самой биомассы микроводорослей, так и ценных для медицины, пищевой промышленности, сельского хозяйства и т.д. органических соединений природного происхождения [1-8]. Особый интерес представляют морские микроводоросли, поскольку в процессе своей жизнедеятельности они способны синтезировать ряд уникальных физиологически активных соединений, аналогов которым нет ни у пресноводных микроводорослей, ни у высших растений, ни у других групп организмов [1,6,8].

Из всего разнообразия микроводорослей в промышленных масштабах используется не более двух десятков [6]. Такая ограниченность во многом обусловлена отсутствием в мире высокопродуктивных промышленных систем культивирования с эффективным перемешиванием суспензии при малых затратах энергии. Например, широко используемые для промышленного культивирования микроводорослей фотобиореакторы типа «бассейн» характеризуются низкими затратами энергии для перемешивания, но малопродуктивны [4]. Из-за неравномерности перемешивания суспензии такие фотобиореакторы не позволяют получать интенсивную культуру микроводорослей, у которых плотность клеток больше единицы, например, культуры «тяжелых» бентосных видов. Высокопродуктивные фотобиореакторы вертикального типа требуют использование дорогостоящего оборудования, а также значительных затрат энергии для перемешивания культуры, более того, из-за проявления эффекта масштабирования затраты энергии возрастают непропорционально объёму суспензии микроводорослей [2-4].

По сути все имеющиеся на сегодняшний день конструкции промышленных фотобиореакторов можно разделить на две группы: фотобиореактор типа «бассейн» с различными вариациями (каналы, каскады, бассейны с уклоном для стекания суспензии) и фотобиореактор вертикального типа (трубы, плоскопараллельный тип). Каждая конструкция обладает своими преимуществами и недостатками, но все они характеризуются тем, что перемешивание осуществляется за счет работы механической мешалки, погруженной в суспензию или барботажа воздуха. Использование механической мешалки для интенсивного перемешивания в значительной степени сужает круг культивируемых объектов, поскольку является достаточно травматичным для клеток многих видов микроводорослей. Перемешивание посредством барботажа воздуха достаточно затратно (не менее 1 Вт/л суспензии), кроме того, для плотной интенсивной культуры существенной проблемой является образование пены на поверхности суспензии.

Наиболее совершенной с точки зрения эффективности перемешивания, затрат энергии на перемешивание суспензии, массообмена, масштабирования, простоты конструкции и удобства в обслуживании является разработка новосибирских ученых – газовихревая система культивирования (рис. 1).

Важным отличием газовихревого фотобиореактора является то, что «мягкое», но активное перемешивание осуществляется за счет создания над суспензией и внутри суспензии вихревых потоков (торнадо) посредством трения воздуха о поверхность суспензии. Такой способ перемешивания обладает рядом преимуществ:

1. Во всем объёме суспензии практически отсутствуют «мертвые» зоны, а также зоны локального завышения плотности суспензии. Клетки во всем объёме распределены равномерно;
2. Мощное придонное течение и восходящий поток в центре фотобиореактора позволяет получить интенсивную культуру любых «тяжелых» неприкрепленных организмов, при этом потоки, перемешивающие культуру максимально приближены к потокам естественных мест обитания бентоса;
3. В плотной культуре микроводорослей на поверхности суспензии практически не образуется пена за счет создания газового вихря над суспензией;



Рисунок 1 – Общий вид лабораторного газовихревого фотобиореактора, объём 5 л. Показан образующийся вихрь в суспензии

4. Вихревой способ перемешивания не является травматичным для любых видов клеток;
5. За счет трения потоков воздуха о поверхность суспензии в значительной степени увеличивается массообмен кислорода и углекислоты между суспензией и атмосферой.

В настоящее время в мире не существует промышленных технологий выращивания бентосных морских микроводорослей, которые являются источником ценных биологически активных продуктов для нужд фармакологии, тонкой химии, пищевой промышленности и т.д. В связи с чем нами была поставлена цель разработать промышленную технологию интенсивного культивирования бентосно-планктонной морской диатомеи *C. closterium* с использованием газовихревого фотобиореактора.

Материалы и методы.

В работе использовали диатомовую водоросль *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin из коллекции культур микроводорослей отдела экологической физиологии водорослей ИМБИ им. А.О. Ковалевского РАН.

Культуру *C. closterium*, полученную из музея адаптировали к разработанной нами ранее питательной среде RS (см. табл. 1) на люминистате при постоянной температуре 15-18 °С и круглосуточном освещении люминесцентными лампами ЛБ-40. После адаптации культуру использовали в качестве инокулята для накопительного культивирования в газовихревой системе культивирования.

Таблица 1 – Состав питательной среды RS для интенсивного культивирования *C. closterium*

Компонент	Навеска, г·л ⁻¹
1. NaNO ₃	0,971
2. NaH ₂ PO ₄ × 2H ₂ O	0,0643
3. Na ₂ SiO ₃ × 9H ₂ O	0,3865
4. Na ₂ EDTA	0,0872
5. FeSO ₄ × 7H ₂ O	0,05
6. CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0,0002
7. ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	0,00044
8. CoCl ₂ × 6 H ₂ O	0,0002
9. MnCl ₂ × 4 H ₂ O	0,00036
10. Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	0,00012

Рабочий объём суспензии в газовихревом фотобиореакторе составлял 580 л, рабочий слой – 0,08 м, освещаемая поверхность – 7,3 кв.м. В качестве источника освещения использовались лампы ДРЛ-700, которые давали среднюю освещённость на поверхности культуры 7,1 клк (≈30 Вт/кв.м). Эксперименты проводили при pH = 8-9. На протяжении всего эксперимента культура *C. closterium* непрерывно перемешивалась за счет создани я вихревых потоков воздуха посредством вращения активатора с частотой 20 Гц (1200 об/мин). Затраты энергии на перемешивание составляли примерно 0,06 Вт/л суспензии. Общий вид промышленной газовихревой системы культивирования представлена на рисунке 2.

Плотность культуры определяли прямым взвешиванием сырой биомассы *C. closterium* в полипропиленовых пробирках на аналитических весах (CAUY-120 с абсолютной погрешностью 0,1 мг) после осаждения клеток центрифугированием (3000 об/мин в течении 2-х минут). Для пересчета полученных данных на сухую массу использовали экспериментальный коэффициент связи между сухой и сырой биомассой (k = 0,1). Для определения сухой массы навески водорослей высушивали до постоянного веса в течение 24 ч при 105 °С [7].



Рисунок 2 – Общий вид промышленного газовихревого фотобиореактора, объём 580 л.

Результаты.

Ниже приведены две накопительные кривые с расчетом биогенных элементов в питательной среде на максимальную плотность культуры 3 г/л и на 7 г/л сухой массы. Из рисунка 3 видно, что максимальная плотность культуры достигла расчетных величин, а максимальная продуктивность культуры *C. closterium* составила 1,2 г/л

(95 г/(кв.м×сут)). Таким образом, использование газовихревой системы культивирования позволило получить продуктивность культуры микроводорослей, превышающую в 3-4 раза показатели других систем культивирования [6].

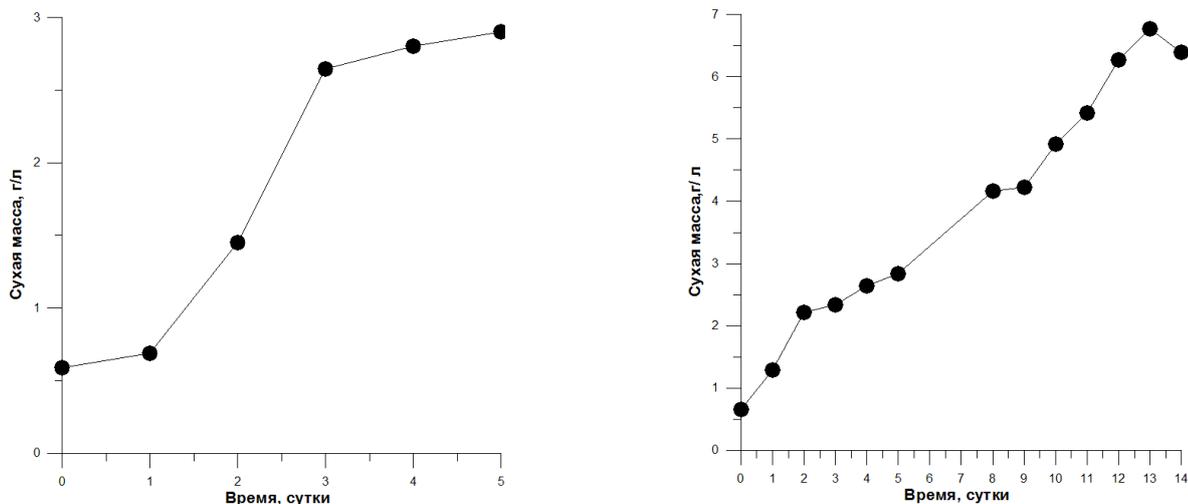


Рисунок 3 – Динамика плотности накопительной культуры *C. closterium* в газовихревом фотобиореакторе на питательной среде RS, рассчитанной на максимальную плотность культуры 3 г/л (слева) и 7 г/л (справа)

Отметим важное обстоятельство, в качестве источника углерода при накопительном культивировании использовался атмосферный CO_2 без дополнительной подачи CO_2 из баллона, что в значительной степени упростило процесс культивирования.

Отделение биомассы от культуральной среды осуществляли посредством фильтрования суспензии через синтетическую гидрофобную ткань. Высушивали биомассу в потоке теплого воздуха (30°C). В результате 15 дней интенсивного культивирования было получено 3,5 кг сухой биомассы *C. closterium*.

Заключение.

При разработке технологии учитывались следующие особенности культуры *C. closterium*:

1. Как представитель бентоса *C. closterium* легко оседает на дно при выключении перемешивания, что позволяет сконцентрировать суспензию в 20 и более раз в течении 1-2 часов без затрат энергии;
2. Спектр поглощения культуры характеризуется максимальной ширитой поглощения света, что позволяет получать плотную интенсивную культуру при относительно малых облученностях (см. рис. 4).

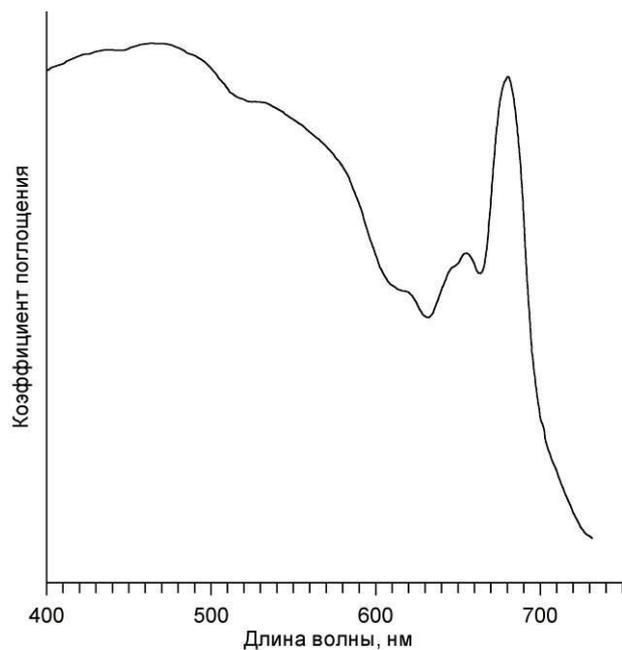


Рисунок 4 – Спектр поглощения культуры *C. closterium*

3. Клетки *C. closterium* в ходе эволюции приобрели способность утилизировать световую энергию более эффективно в сравнении с планктонными видами, поэтому продуктивность *C. closterium* в сравнении с другими видами микроводорослей выше.

4. Несмотря на то, что клетки цилиндротехи достаточно малы (6-20 мкм) при сгущении суспензии они агглютинируют и образуют конгломераты, что позволяет использовать наиболее дешевый метод отделения биомассы от культуральной среды – фильтрование.

Список литературы / References:

1. Макарова Е.И., Отурина И.П., Сидякин А.И. Прикладные аспекты применения микроводорослей – обитателей водных экосистем. *Экосистемы, их оптимизация и охрана*, 2009, вып. 20, с. 120-133. [Makarova E.I., Oturina I.P., Sidiyakin A.I. Applied aspects of algae – the inhabitants of aquatic ecosystems. *Optimization and Protection of Ecosystems*, 2009, vol. 20, p. 120-133. (In Russ.)]

2. Волова Т.Г. *Биотехнология*. Новосибирск: СО РАН, 1999, 252 с. [Volova T.G. *Biotechnology*. Novosibirsk, Russian Academy of Sciences, 1999, 252 p. (In Russ.)]

3. Цоглин Л.Н., Пронина Н.А. *Биотехнология микроводорослей*. М.: Научный мир, 2012, 184 с. [Tsoglin L.N. Pronina N.A. *Biotechnology of microalgae*. М.: Science World, 2012, 184 p. (In Russ.)]

4. Онищенко Е.М. К вопросу о путях повышения эффективности наземных открытых систем культивирования микроводорослей. *Живые и биокосные системы*, 2015, № 14, URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue-14/article-11>. [Onischenko E.M. The question on how to improve the efficiency of public land microalgae cultivation systems. *Living and biokosny system*, 2015, no. 14, URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue-14/article-11> (In Russ.)]

5. Дворецкий Д.С., Дворецкий С.И., Темнов М.С. [и др.]. *Технология получения липидов из микроводорослей* [Электронный ресурс]: монография. Тамбов: Изд-во ФГБОУ ВПО «ТГТУ», 2015, 1 электрон. опт. диск (CD-ROM). [Butler D.S., Butler S., Temnov M.S. [et al.]. *Lipids technology from microalgae* [electronic resource]: Monograph. Tambov: Publishing House of VPO "TSTU", 2015, 1 electron. wholesale. disk (CD-ROM). (In Russ.)]

6. Минюк Г.С., Дробецкая И.В. [и др.] Одноклеточные водоросли как возобновляемый биологический ресурс: обзор. *МЭЖ*, 2008, № 2, с. 5-23. [Minyuk G.S., Drobetsky I.V. [et al.] Single-celled algae as a renewable biological resource: a review. *International Research Journal*, 2008, no. 2, pp. 5-23. (In Russ.)]

7. Сиренко Л.А., Сакевич А.И., Осипов Л.Ф. [и др.]. *Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике*. К.: Наукова думка, 1975, 212 с. [Sirenko L.A., Sakevich A.I., Osipov L.F. [et al.] *Methods of physiological/biochemical research of algae in hydrobiological practice*. Kiev: Naukova dumka, 1975, pp. 75-212. (In Russ.)]

8. Сиренко Л.А., Козицкая В.Н. *Биологически активные вещества водорослей и качество воды*. К.: Наук. думка, 1998, 256 с. [Sirenko L.A., Kozitskaya V.N. *Bioactive substance of algae and water quality*. Kiev.: Naukova Dumka, 1998, 256 p. (In Russ.)]

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ЗАВИСИМОСТИ ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ КУЛЬТУРЫ ОТ БИОМАССЫ МИКРОВОДОРΟΣЛЕЙ

Тренкеншу Р.П.¹, Лелеков А.С.², Гаврилов П.Е.², Набойщиков В.С.²

¹ ФГБУН Институт морских биологических исследований им. А.О.Ковалевского РАН
пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ
e-mail: trenkens@yandex.ru

² ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»
ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ
e-mail: a.lelekov@yandex.ru

Аннотация. В работе рассмотрены вопросы применимости уравнения Бугера-Ламберта-Бера при определении биомассы микроводорослей по оптической плотности культуры. Анализ литературных данных показал, что вследствие высокой гетерогенности культуры микроводорослей, а также для культур высокой плотности, наблюдаются значительные отклонения от линейной зависимости между оптической плотностью и биомассой микроводорослей. Предложена математическая модель, позволяющая описать зависимость оптической плотности культуры от биомассы микроводорослей в форме степенной функции. Модель основана на предположении о том, что каждая клетка поглощает одинаковое количество световой энергии, не изменяется в размерах и имеет фиксированную площадь поверхности. Показано, что экспериментальные данные зависимости пропускания от биомассы микроводорослей могут быть описаны полученным уравнением с высокой точностью ($R^2 = 0,99$). В отличие от уравнения Бугера-Ламберта-Бера, оптическая плотность культуры и биомасса микроводорослей взаимосвязаны нелинейно.

Ключевые слова: уравнение Бугера-Ламберта-Бера, интенсивность света, коэффициент экстинкции.