

УДК 574; 591.544

**А.И. БОЖКОВ, Е.И. СЫСЕНКО, Н.Г. МЕНЗЯНОВА, В.Ю. КИЗИЛОВА**

НИИ биологии Харьковского нац. ун-та им. В.Н. Каразина,

пл. Свободы, 4, 61022 Харьков, Украина

e-mail: bozhkov@univer.kharkov.ua

### **ДИНАМИКА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ЭПИГЕНОТИПОВ *DUNALIELLA VIRIDIS* TEODOR. ПРИ НАКОПИТЕЛЬНОМ И КВАЗИНЕПРЕРЫВНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ**

Исследовали динамику эпигенотипов *Dunaliella viridis* при накопительном и квазинепрерывном культивировании. Установлено, что паттерн содержания нуклеиновых кислот, белков, триацилглицеридов,  $\beta$ -каротина, который характеризует эпигенотип, зависит от условий культивирования микроводорослей. Квазинепрерывное культивирование *D. viridis* позволяет увеличить выход биомассы на 23 % по сравнению с накопительным культивированием, при этом удельная продуктивность в 3 раза меньше, чем при накопительном культивировании. Обнаружено, что интенсивность роста микроводорослей коррелирует с накоплением экзополисахаридов в культуральной среде.

Ключевые слова: *Dunaliella viridis*, эпигенотип, состав биомассы, накопительное культивирование, квазинепрерывное культивирование.

#### **Введение**

Интенсивное культивирование микроводорослей используется в технологиях получения биотоплива (Abou-Shanab et al., 2012; Yao et al., 2012; Camprenni et al., 2013), биологически активных веществ (Christaki et al., 2012; Graziani et al., 2013) и медицинских препаратов (Mimouni et al., 2012; Soontornchaiboon et al., 2012; Amaro et al., 2013). Этот процесс предполагает высокую скорость накопления биомассы микроводорослей. При разработке интенсивных методов их культивирования, как правило, используют накопительные или квазинепрерывные культуры (Roleda et al., 2013; Samori et al., 2013). К сожалению, существующие методы массового выращивания микроводорослей характеризуются очень низкой рентабельностью и требуют значительных капиталовложений. Поэтому разработка высокорентабельных способов их культивирования чрезвычайно актуальна.

Многолетний опыт работы с культурами микроводорослей, в частности водорослями рода *Dunaliella*, показал, что частота их пересевов в условиях интенсивного культивирования влияет на состав биомассы (Bozhkov et al., 2009). Для решения этой проблемы необходимо, с одной стороны, обеспечить высокий выход биомассы микроводорослей и целе-

© А.И. Божков, Е.И. Сысенко, Н.Г. Мензянова, В.Ю. Кизилова, 2013

вых метаболитов, а с другой – получить биомассу микроводорослей определенного и относительно стабильного состава.

Трудность решения этой задачи заключается в том, что при подборе интенсивных способов культивирования клетки адаптируются к новым условиям их выращивания. В процессе такой адаптации формируется новый метаболический паттерн – эпигенотип, вследствие чего состав биомассы микроводорослей характеризуется высокой вариабельностью в различных условиях культивирования (Божков и др., 2008). При разработке интенсивных способов культивирования невозможно заранее предсказать состав биомассы микроводорослей в новых условиях.

Одним из путей решения этой сложной проблемы является исследование динамики формирования эпигенотипов микроводорослей в различных условиях культивирования.

Ранее было показано, что в режиме накопительного культивирования (НК) формируются возрастзависимые эпигенотипы – паттерн метаболических показателей, определяющих особенности адаптации культуры к изменяющимся физико-химическим условиям (Божков и др., 2011). Характеристика возрастзависимых эпигенотипов представляет интерес с нескольких позиций. Во-первых, эпигенотипы, которые формируются в различных условиях культивирования и на разных стадиях роста микроводорослей, определяют особенности биохимического состава их биомассы. Во-вторых, динамика эпигенотипов в процессе культивирования демонстрирует отсутствие жестких связей и наличие высокой вариабельности между различными метаболическими параметрами. Эту вариабельность необходимо учитывать в условиях массового культивирования микроводорослей. И наконец, различия в динамике эпигенотипов могут отражать формирование различных механизмов адаптации в изменяющихся условиях среды.

Целью данной работы было исследование взаимосвязи между интенсивностью роста микроводорослей и динамикой эпигенотипов.

## Материалы и методы

Для характеристики эпигенотипов *D. viridis* использовали показатели первичного метаболизма (содержание нуклеиновых кислот, белка), вторичного метаболизма (содержание триацилглицеридов и  $\beta$ -каротина) и экзополисахаридов (ЭПС).

### 1. Культивирование микроводорослей *Dunaliella viridis*

В экспериментах использовали альгологически чистую культуру одноклеточных зеленых микроводорослей *D. viridis* var. *viridis* f. *euchlora*, штамм IBASU-A N29.

Условия культивирования

Микроводоросли культивировали на среде Артари в условиях круглосуточного освещения (4 кЛк) при температуре 26–28 °С. Начальная клеточная плотность для культур составляла 1,3 млн кл./мл. Культивирование проводили двумя способами:

1) в колбах Эрленмейера емкостью 250 мл, объем клеточной суспензии 20 мл, толщина культурального слоя 0,5 см. Для уменьшения испарения жидкости колбы закрывали полиэтиленовой пленкой;

2) в плоскопараллельных реакторах высотой 9 см, шириной 39 см, длиной 26 см, объем клеточной суспензии 1,5 л, толщина культурального слоя 1,5 см. Реакторы накрывали стеклянными крышками и ежедневно для компенсации испарения в реакторы добавляли необходимое количество дистиллированной воды.

Культивирование микроводорослей проводили без дополнительного барботирования, но ежедневно механически перемешивали суспензию клеток (1 раз в сутки в течение 5–10 мин). Сразу после перемешивания отбирали аликвоты для определения количества клеток (которое подсчитывали в камере Горяева), содержания хлорофиллов, белка, нуклеиновых кислот и липидов в клетках, а также экзополисахаридов (ЭПС) в культуральной среде.

Режимы культивирования микроводорослей

*Накопительное культивирование (НК).* Микроводоросли культивировали без отбора биомассы и внесения свежих порций культуральной среды до выхода на стационарный уровень.

*Квазинепрерывное культивирование (КНК).* В этом режиме, начиная с 14-х суток культивирования, каждые 7 дней отбирали 50 % клеточной суспензии *D. viridis* и вносили такой же объем свежей среды Артари.

## 2. Определение содержания хлорофиллов (*a + b*), нейтральных липидов, β-каротина, нуклеиновых кислот

Для определения биохимических показателей в каждой экспериментальной точке объединяли биомассу микроводорослей из 3 колб (общий объем клеточной суспензии 60 мл). В трех экспериментальных повторностях использовали клеточный материал из 50 колб. При определении биохимических показателей в биомассе микроводорослей, которые выращивали в культиваторе, для анализа отбирали такой же объем клеточной суспензии (60 мл).

Клетки микроводорослей осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 20 мин, затем осадок дважды промывали средой Артари для удаления экзометаболитов. К отмытым осадкам клеток последовательно добавляли смеси органических растворителей хлороформ–метанол (1:2) и хлороформ–метанол–вода (1:2:0.8). В полученном хлороформном экстракте определяли содержание хлорофиллов, липидов и β-каротина (Bozhkov, Menzyanova, 1997).

#### Определение хлорофиллов ( $a + b$ )

Для оценки суммарного содержания хлорофиллов ( $a + b$ ) определяли экстинкцию хлороформного экстракта при  $\lambda = 649$  и  $665$  нм на спектрофотометре СФ-46 (ЛОМО, Россия). Содержание хлорофиллов рассчитывали по формуле (Гавриленко и др., 1975):

$$C_{\text{хл. } (a+b)} = 6,10 E_{665} + 20,04 E_{649}$$

и выражали в мкг/млн кл.

#### Определение содержания нейтральных липидов и $\beta$ -каротина

Хлороформные экстракты анализировали методом тонкослойной хроматографии на пластинах Sorbfil (Россия) в системе растворителей гексан–диэтиловый эфир (4:1). Окрашенную в желто-оранжевый цвет фракцию на линии фронта растворителя идентифицировали с помощью свидетеля как  $\beta$ -каротин. Фракцию  $\beta$ -каротина соскабливали и элюировали смесью хлороформ–метанол (2:1). Экстинкцию элюата определяли при  $\lambda = 440$  нм на спектрофотометре СФ-46 (ЛОМО, Россия). Содержание  $\beta$ -каротина в клетках водорослей рассчитывали по калибровочной кривой и выражали в мкг/млн кл.

После удаления фракции  $\beta$ -каротина фракции липидов визуализировали в парах  $J_2$  и идентифицировали с помощью свидетелей. Для количественного определения фракции липидов соскабливали, элюировали смесью хлороформ–метанол (1:2). Экстракты упаривали досуха и минерализовали в течение 20 мин в концентрированной  $H_2SO_4$  при температуре  $180$  °С. Затем пробы разбавляли водой и определяли экстинкцию при  $\lambda = 400$  нм на спектрофотометре СФ-46 (ЛОМО, Россия) (Грибанов, Сергеев, 1975). Содержание фракций липидов рассчитывали по калибровочным кривым и выражали в мкг/млн кл.

#### Определение содержания нуклеиновых кислот и белка в клетках *D. viridis*

Осадки после экстракции липидов и пигментов дважды промывали смесью органических растворителей хлороформ–метанол (1:2). Затем осадки 3 раза промывали 5 %  $HClO_4$  при  $4$  °С. Гидролиз РНК проводили в щелочной среде (0,3 N KOH, 1,5 ч,  $37$  °С), ДНК – в кислой среде (5 %  $HClO_4$ , 20 мин,  $100$  °С). Экстинкцию гидролизатов определяли при  $\lambda = 270$  и  $290$  нм. Содержание нуклеиновых кислот рассчитывали по формуле (Спирин, 1958):

$$C_{\text{РНК}} = [(E_{270} - E_{290}) \cdot 0,19] \cdot 10,5;$$

$$C_{\text{ДНК}} = [(E_{270} - E_{290}) \cdot 0,19] \cdot 10,1$$

и выражали в мкг/млн кл.

Осадки после гидролиза нуклеиновых кислот растворяли в 1 N NaOH, определяли содержание белка по методу Лоури (Lowry et al., 1957) и выражали в мкг/млн кл.

### 3. Определение содержания экзополисахаридов в культуральных фильтратах *D. viridis*

Культуральные фильтраты получали после осаждения клеток микроводорослей при 12000 об./мин, в течение 15 мин, ЭПС выделяли по известному методу (Nogiuchi et al., 2003). Для этого в культуральных фильтратах значения pH доводили до 10,0–10,3 путем внесения 1 N NaOH. Для формирования осадка ЭПС пробы инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем их центрифугировали (при 12000 g, 15 мин, 4 °C). Полученные осадки ЭПС дважды промывали 50 mM CaCl<sub>2</sub>, затем растворяли в 50 mM ЭДТА и определяли углеводы фенольным методом (Dubois et al., 1956). Содержание ЭПС выражали в мкг глюкозы/мл среды.

### 4. Статистическая обработка результатов

Эксперименты проводили в трех повторностях с 4 биологическими повторами для каждой экспериментальной точки. Результаты статистически обрабатывали по методу Стьюдента-Фишера. Достоверность различий между выборками определяли с помощью непараметрического метода, используя U-критерий Манна-Уитни (Гублер, Генкин, 1973).

#### Результаты исследования

##### *Интенсивность роста и характеристика эпигенотипов D. viridis при накопительном культивировании*

При культивировании микроводорослей в конических колбах Эрленмейера (начальная клеточная плотность 1,3 млн/мл) выход в стационарную фазу наблюдался на 30-е сутки роста. В случае культивирования в реакторах плоского типа (начальная клеточная плотность 1,3 млн/мл) стационарная фаза также наступала на 28–30-е сутки роста (рис. 1). При этом в стационарной фазе концентрация клеток в колбах составляла 9–10 млн/мл, а в реакторах – 16–18 млн/мл.

В экспоненциальной фазе (10–14-е сутки роста) концентрация клеток при культивировании в колбах и плоскопараллельных реакторах была одинаковой, но паттерны метаболических показателей в различных условиях культивирования существенно отличались (рис. 2). Так, в клеточной биомассе, полученной из плоскопараллельных реакторов, содержание белка было в 2,6 раза больше, а содержание РНК, β-каротина и триацилглицеридов, соответственно, в 3,7; 6,0 и 3,9 раза меньше чем в клеточной биомассе, полученной из колб (см. рис. 2).

Выход культур микроводорослей в стационарную фазу роста сопровождался формированием нового паттерна метаболических показателей как в колбах, так и в реакторах (см. рис. 2, 3). Паттерны метаболических показателей в стационарной фазе роста значительно отличались от паттернов в экспоненциальной фазе роста.

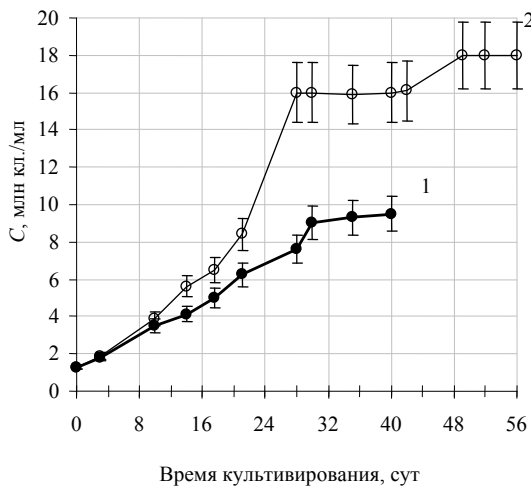


Рис. 1. Динамика роста микроводорослей *Dunaliella viridis* в колбах Эрленмейера (1) и в плоскопараллельных реакторах (2)

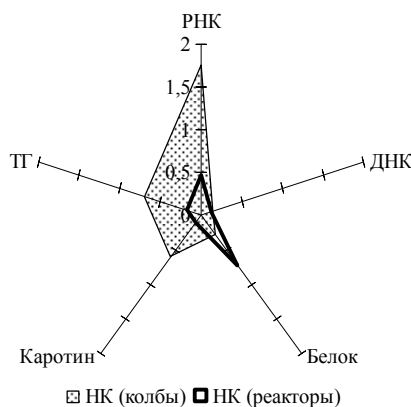


Рис. 2. Функциональные эпигенотипы, формирующиеся в экспоненциальной фазе роста микроводорослей *Dunaliella viridis* в условиях НК в колбах Эрленмейера (10-е сутки) и в плоскопараллельных реакторах (14-е сутки). Содержание белка выражено в мкг/10<sup>5</sup>кл., содержание ДНК, РНК, ТГ и β-каротина – в мкг/10<sup>6</sup> кл.

Динамика паттернов метаболических показателей существенно различалась для реакторов и колб. Так, при культивировании в колбах в биомассе микроводорослей в стационарной фазе роста содержание белка, β-каротина и триацилглицеридов было в 2,2; 2,9 и 1,4 раза больше,

чем в экспоненциальной фазе. Содержание нуклеиновых кислот в экспоненциальной и стационарной фазах роста отличалось незначительно (табл. 1).

Таблица 1

Содержание РНК, ДНК,  $\beta$ -каротина и триацилглицеридов (ТГ) в клетках микроводорослей *Dunaliella viridis* в различных фазах роста в условиях НК

Условия культивирования		РНК	ДНК	Белок	$\beta$ -каротин	ТГ
мкг/млн кл.						
Колбы	Экспон. фаза	1,740±0,253	0,140±0,021	2,80±0,042	0,600±0,090	0,700±0,105
	Стац. фаза	1,752±0,263	0,180±0,027	6,20±0,093	1,750±0,263	0,970±0,146
	$\Delta$ , раз	+0,99	+0,78	+2,2	+2,9	+1,4
Реакторы	Экспон. фаза	0,477±0,071	0,121±0,018	7,300±1,100	0,100±0,020	0,180±0,030
	Стац. фаза	0,474±0,032	0,050±0,001	1,950±0,250	0,180±0,080	1,480±0,120
	$\Delta$ , раз	-1,01	-2,4	-3,74	+1,8	+8,2

Обозначения.  $\Delta$  – Различия между показателями в экспоненциальной и стационарной фазе роста, где «+» – увеличение, «-» – уменьшение абсолютных значений, «0» – отсутствие различий.

При культивировании в реакторах в биомассе микроводорослей в стационарной фазе роста содержание белка было в 3,6 раза меньше, содержание  $\beta$ -каротина и триацилглицеридов, соответственно, в 1,8 и 8 раз больше, чем в экспоненциальной фазе роста (см. табл. 1). При этом в стационарной фазе содержание ДНК в биомассе было в 2,4 раза меньше, чем в экспоненциальной фазе (см. табл. 1).

Следовательно, условия культивирования существенно влияют на формирование эпигенотипов, что подтверждается изменением соотношений между исследованными параметрами. Можно полагать, что в процессе культивирования в колбах и реакторах формируются специфические физико-химические условия, определяющие особенности адаптации микроводорослей. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в результате адаптации микроводорослей формируются специфические метаболические паттерны – эпигенотипы.

Исходя из этого, можно предположить, что стабилизация физико-химических условий в процессе культивирования позволит уменьшить

вариабельность эпигенотипов, которая является одной из важнейших проблем в различных биотехнологиях и экспериментальной альгологии.

На следующем этапе работы мы определяли метаболические паттерны в клетках *D. viridis* в условиях КНК.

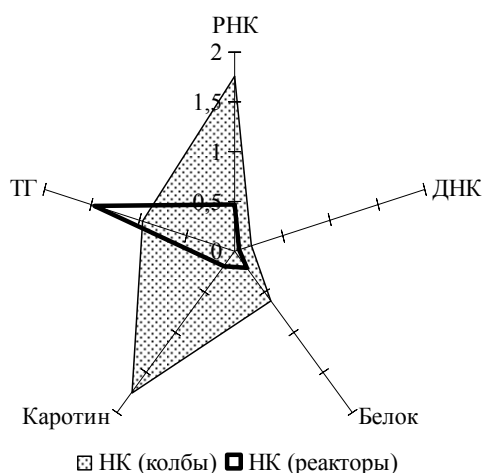


Рис. 3. Функциональные эпигенотипы, формирующиеся в стационарной фазе роста микроводорослей *Dunaliella viridis* в условиях НК в колбах Эрленмейера (40-е сутки) и в плоскопараллельных реакторах (56-е сутки). Содержание белка выражено в мкг/10<sup>5</sup> кл., содержание ДНК, РНК, ТГ и β-каротина – в мкг/10<sup>6</sup> кл.

Интенсивность роста и характеристика эпигенотипов  
*D. viridis* в условиях КНК в плоскопараллельных реакторах

На 14-е сутки роста, т.е. в середине экспоненциальной фазы роста, 50 % клеточной суспензии удаляли вместе со средой и в реактор вносили такой же объем свежей среды Артари. Процедуру отбора осуществляли каждые 7 дней в течение 56 дней роста. Этот режим культивирования был принят за КНК по схеме (14→7+7...).

После отбора концентрация клеток восстанавливалась до исходного значения 5–6 млн кл./мл за 7 дней культивирования (рис. 4). Повторение цикла отбора и роста позволило поддерживать концентрацию клеток на постоянном уровне на протяжении 42 дней роста (14–56-е сутки) (см. рис. 4). Следовательно, по концентрации клеток на протяжении 42-х дней роста культура соответствовала 14-м суткам, т.е. середине экспоненциальной фазы НК.

В условиях НК выход сухой биомассы из плоскопараллельного реактора за 56 дней составил 2,5±0,04 г, а удельная продуктивность – 1,68±0,06 г/л. В условиях КНК выход сухой биомассы за этот же период составил 3,08±0,02 г (т.е. на 23 % больше, чем для НК). Но удельная



продуктивность была в 3 раза меньше ( $0,51 \pm 0,01$  г/л), чем при НК (табл. 2).

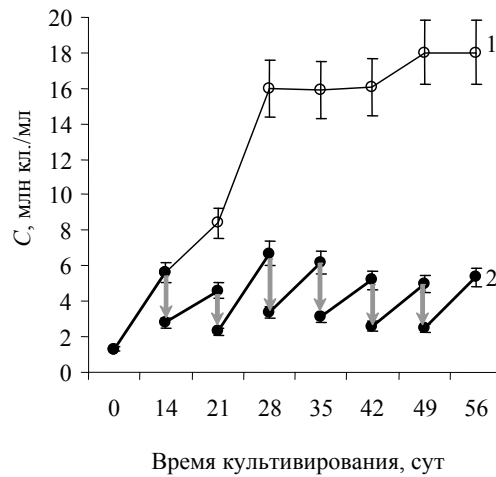


Рис. 4. Динамика роста микроводорослей *Dunaliella viridis* в плоскопараллельных реакторах в условиях НК (1) и КНК (2)

Таблица 2

**Суммарный выход сухой биомассы микроводорослей *Dunaliella viridis* и удельная продуктивность культуры микроводорослей в различных режимах культивирования**

Режим культивирования	Суммарный выход биомассы, г/реактор	Удельная продуктивность, г/л	Общий объем среды культивирования, л
НК	$2,50 \pm 0,04$	$1,68 \pm 0,06$	1,5
КНК	$3,08 \pm 0,02$	$0,51 \pm 0,01^*$	6,0

Примечание: здесь и в табл. 4 звездочкой отмечены значения для варианта КНК, достоверно отличающиеся от значений для варианта НК ( $p < 0,05$ ). Время культивирования 56 суток.

Следовательно, при КНК (14→7+7...) происходит увеличение общего выхода сухой биомассы в расчете на реактор на 23 % по сравнению с НК. Однако частый отбор клеточной биомассы и замена среды снижают удельную продуктивность культуры микроводорослей.

Весьма вероятно, что изменение условий КНК, например, реализация частичных отборов клеточной биомассы не на 14-е сутки (в экспоненциальной фазе), а на 28-й день (в стационарной фазе) может привести к увеличению удельной продуктивности.

Далее были проанализированы особенности эпигенотипов на поздних этапах культивирования (56-е сутки) в условиях КНК и НК. Уста-

новлено, что в условиях НК в стационарной фазе в биомассе микроводорослей содержание  $\beta$ -каротина увеличивается в 1,8 раза, а триацилглицеридов – в 8 раз по сравнению с экспоненциальной фазой (табл. 3). Накопление продуктов вторичного обмена может служить маркером старения клеточных культур (Божков и др., 2011).

Таблица 3

Состав биомассы *Dunaliella viridis* на 14-е и 56-е сутки роста в различных условиях культивирования

Условия культивирования	РНК	ДНК	Белок	$\beta$ -каротин	ТГ
НК 14-е сутки (экспоненциальная фаза)	0,477 $\pm$ 0,071	0,121 $\pm$ 0,018	7,300 $\pm$ 1,100	0,100 $\pm$ 0,020	0,180 $\pm$ 0,030
НК 56-е сутки (стационарная фаза)	0,474 $\pm$ 0,032	0,050 $\pm$ 0,001	1,950 $\pm$ 0,250	0,180 $\pm$ 0,080	1,480 $\pm$ 0,120
КНК 56-е сутки (стационарная фаза)	0,354 $\pm$ 0,053	0,046 $\pm$ 0,006	1,300 $\pm$ 0,150	0,080 $\pm$ 0,001	0,140 $\pm$ 0,020

В биомассе микроводорослей содержание  $\beta$ -каротина и триацилглицеридов на 56-е сутки роста в условиях КНК и в экспоненциальной фазе роста в условиях НК отличалось незначительно, однако было существенно ниже, чем на 56-е сутки роста в условиях НК (см. табл. 3).

В условиях НК значительные различия были выявлены в содержании белка, ДНК и ТГ в биомассе микроводорослей на 14-е и 56-е сутки роста (см. табл. 3). Возможно, в условиях КНК формируется эпигенотип, который сильно отличается от вариантов эпигенотипов в экспоненциальной и стационарной фазах в условиях НК.

Известно, что в процессе роста микроводоросли *D. viridis* экскретируют в среду полисахариды (Mohamed, 2008; Angelis et al., 2012; Fiori et al., 2012; Geun Goo et al., 2012). Интерес к ЭПС микроводорослей связан с их возможным использованием:

- в пищевых и фармакологических технологиях в качестве альтернативы пектину высших растений (Fang et al., 2008);
- в фармацевтической индустрии в качестве противовирусных, антиканцерогенных и иммуностимулирующих агентов (Jeong et al., 2012);
- в качестве эффективных хелаторов тяжелых металлов (Papegi et al., 2006; Micheletti et al., 2008).

Экзополисахариды могут функционировать как временное экстраклеточное депо углеводов и в зависимости от функциональных потребностей повторно транспортироваться в клетки (Yang et al., 2008).

В условиях НК на 56-е сутки роста выход ЭПС из одного реактора составил  $48 \pm 9,8$  мг при удельной продуктивности  $32,5 \pm 6,5$  мг/л (см. табл. 4). В условиях КНК общий выход ЭПС составил  $35 \pm 6,3$  мг из реактора, а удельная продуктивность была в 5 раз меньше ( $6,5 \pm 1,1$  мг/л), чем в условиях НК (см. табл. 4).

Таблица 4

Суммарный выход экзополисахаридов и их удельная продуктивность в культуре микроводорослей *Dunaliella viridis* в различных режимах культивирования

Режим культивирования	Выход ЭПС, мг глюкозы/реактор	Удельная продуктивность, мг глюкозы/л	Общий объем среды культивирования, л
НК	$48,0 \pm 9,8$	$32,5 \pm 6,5$	1,5
КНК	$35,0 \pm 6,3$	$6,5 \pm 1,1^*$	6,0

Учитывая выявленные различия, на следующем этапе работы определяли динамику содержания ЭПС в условиях НК и КНК.

В режиме НК содержание ЭПС в культуральной среде в экспоненциальной фазе роста составляло 7–8 мг глюкозы/л, а в стационарной – 21–33 мг глюкозы/л (см. рис. 5). В условиях КНК содержание ЭПС в среде культивирования не превышало 10 мг глюкозы/л, что в 2–4 раза меньше, чем в условиях НК (рис. 5).

Кроме того, в условиях НК и КНК динамика содержания ЭПС в культуральной среде совпадала с динамикой роста клеток в культуре (рис. 4, 5).

Как уже отмечалось, интенсивность роста *D. viridis* в условиях КНК была значительно ниже, чем в условиях НК. Снижение интенсивности роста микроводорослей может быть связано с тем, что удаление 50 % клеток и культуральной среды является стрессом для клеточной популяции микроводорослей. Известно, что одной из основных реакций клеточных культур микроводорослей на стресс является снижение их интенсивности роста (Fiori et al., 2012; Jiang et al., 2012).

В условиях КНК формирование стрессовой ситуации может быть связано со скачкообразным снижением концентрации экзометаболитов, снижением оптической плотности культуры и увеличением интенсивности освещения. Резкие колебания интенсивности освещения могут значительно влиять на активность фотосинтетического аппарата клетки и, вследствие этого, на интенсивность роста микроводорослей.

Определение динамики содержания хлорофиллов *a* и *b* в биомассе микроводорослей в условиях НК и КНК показало, что в случае НК со-

держание хлорофиллов *a* и *b* достоверно увеличивалось в период с 14-х по 21-е сутки роста. После выхода на стационарную фазу роста содержание хлорофиллов *a* и *b* уменьшалось и на поздних этапах этой фазы достоверно не изменялось (рис. 6).

В условиях КНК содержание хлорофиллов *a* и *b* в биомассе микроводорослей было значительно меньше, чем при НК, в среднем в 1,5 раза (см. рис. 6). Низкое содержание хлорофиллов коррелировало со снижением интенсивности роста микроводорослей в условиях КНК.

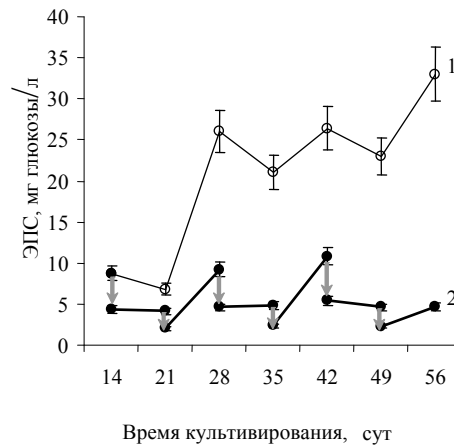


Рис. 5. Динамика накопления ЭПС (мкг глюкозы/мл) в культуральной среде микроводорослей *Dunaliella viridis* в условиях НК (1) и КНК (2) в плоскопараллельных реакторах

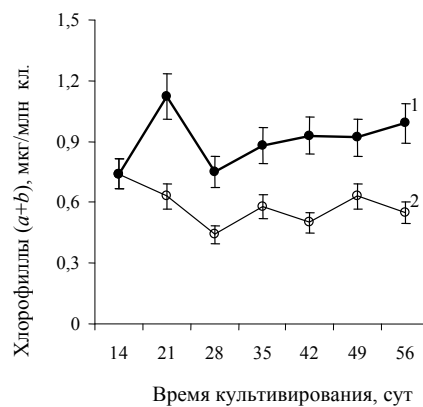


Рис. 6. Динамика содержания хлорофиллов (*a* + *b*) в клетках микроводорослей *Dunaliella viridis* в условиях НК (1) и КНК (2) в плоскопараллельных реакторах

## Обсуждение

Микроводоросли, в частности микроводоросли рода *Dunaliella*, являются перспективным объектом современных биотехнологий. Это связано с уникальным составом биомассы, относительно высокой скоростью роста в природных популяциях (Ben-Amotz et al., 1995; Garcia-Gonzalez et al., 2003; Tafresh et al., 2006).

В настоящее время биомассу этой водоросли получают в основном в открытых автотрофных системах, использующих солнечную энергию (Borowitzka et al., 1990; Garcia-Gonzalez et al., 2003, Tafresh et al., 2006; Del Campo et al., 2007). К сожалению, разработка интенсивных методов культивирования водорослей рода *Dunaliella*, которые активно ведутся с 60–70-х гг. XX в. (Soeder, 1980), не привела к созданию эффективных промышленных технологий. Из-за невысокой стоимости биомассы и значительной вариабельности ее состава промышленное культивирование этих микроводорослей низкорентабельно.

Существует представление, что высокая вариабельность содержания липидов, витаминов, белков в биомассе микроводорослей связана с нестандартными условиями культивирования. Нет сомнений, что стандартизация условий является важнейшим этапом в любых биологических производствах. Однако культивирование *D. viridis* даже в строго стандартных условиях не позволяет получать стабильный и стандартный выход целевых продуктов (Мензянова, 2002).

Результаты данной работы показали, что в плоских реакторах открытого типа при небольшой толщине культурального слоя на 28–30-е сутки роста концентрация клеток была в 2 раза больше, чем в колбах Эрленмейера (16–18 и 8–10 млн кл./мл соответственно). В обоих вариантах культуры выходили на стационарную фазу роста практически одновременно, на 29–30-е сутки культивирования.

Эти результаты указывают на то, что в случае открытых реакторов, даже без использования систем аэрации, можно получать относительно высокий выход биомассы.

В реакторе открытого типа на стадии экспоненциального роста можно выделить две фазы. Так, первые 10 дней интенсивность роста культуры в реакторе и колбах была одинаковой, в период с 10-х по 28-е сутки в реакторах она была выше, чем в колбах (см. рис. 1).

Перевод накопительной культуры на 14-е сутки в режим КНК по схеме (14→7+7...) обеспечивал регулярное восстановление численности клеток за последующие 7 суток роста, но при этом удельная продуктивность за весь период культивирования была значительно ниже по сравнению с НК.

Учитывая, что при КНК проводили 50 %-ю замену среды, можно было ожидать значительного сокращения лаг-фазы, следовательно, более высокой скорости роста по сравнению с полной заменой культуральной среды. Однако этого не наблюдалось. Можно полагать, что в условиях КНК совокупность повторяющихся скачкообразных измене-

ний концентрации экзометаболитов и солей в среде, интенсивности освещенности (за счет уменьшения клеточной плотности) является стрессом для клеточной популяции микроводорослей и приводит к уменьшению содержания хлорофиллов и в результате – к снижению интенсивности роста.

Наиболее важным результатом этой работы явились выявленные особенности динамики эпигенотипов в различных условиях культивирования. Динамика паттернов метаболических показателей в условиях НК и КНК указывает на высокую реактивность не только обмена белков и нуклеиновых кислот, содержания хлорофиллов, но и вторичного метаболизма в клетках *D. viridis*. Эти результаты подтверждают полученные ранее данные о высокой чувствительности клеток *D. viridis* не только к локальным, но и глобальным факторам, а также к комбинированным их воздействиям (Божков и др., 2008). Разнообразие биотропных эффектов комбинированных воздействий локальных и глобальных факторов выражается в неопределенности функционирования биологических систем (Bozhkov et al., 2008).

### Выводы

1. Культивирование *Dunaliella viridis* в квазинепрерывном режиме по схеме (14→7+7...) позволило увеличить выход биомассы в расчете на реактор на 23 % по сравнению с накопительным культивированием за тот же период времени, однако удельная продуктивность при этом снижалась.

2. Культивирование *D. viridis* в различных условиях (колбы и культиваторы, толщина слоя 0,5 см и 1 см, накопительный и квазинепрерывный режим культивирования) сопровождалось изменениями в составе метаболитов (ДНК, РНК, белок, триацилглицериды и β-каротин), что отражает формирование различных эпигенотипов.

3. Интенсивность роста микроводорослей *D. viridis* при разных режимах культивирования коррелирует с накоплением ЭПС в культуральной среде и содержанием хлорофиллов *a* и *b* в клетках.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Божков А.И., Ковалёва М.К., Мензянова Н.Г. Можно ли «отменить» процесс старения клеточных культур созданием оптимальных условий культивирования? // Усп. геронтол. – 2011. – 24, № 1. – С. 26–37.
- Божков А.И., Мензянова Н.Г., Ковалёва М.К. Годовой ритм интенсивности роста культур микроводоросли *Dunaliella viridis* Teodog. и флуктуации некоторых геофизических факторов // Альгология. – 2008. – 18, № 3. – С. 229–243.
- Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М. Большой практикум по физиологии растений. – М.: Высш. шк. – 1975. – 127 с.
- Грибанов Г.А., Сергеев С.А. Экспресс-микроанализ общих липидов сыворотки крови и их фракций // Вопр. мед. химии. – 1975. – 26. – С. 652–655.

- Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. — Л.: Медицина, 1973. — 141 с.
- Мензянова Н.Г. Интенсивность роста и состав биомассы в периодической культуре *Dunaliella viridis* Teodor. (*Chlorophyta*) // Альгология. — 2002. — **12**, № 1. — С. 59–68.
- Спирин А.С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот // Биохимия. — 1958. — **23**. — С. 656–662.
- Abou-Shanab R.A., Ji M.K., Kim H.C. et al. Microalgal species growing on piggery wastewater as a valuable candidate for nutrient removal and biodiesel production // J. Environ. Manage. — 2012. — **115C**. — P. 257–264.
- Amaro H.M., Barros R., Guedes A.C. et al. Microalgal compounds modulate carcinogenesis in the gastrointestinal tract // Trends Biotechnol. — 2013. — **31**, N 2. — P. 92–98.
- Angelis S., Novak A.C., Sydney E.B. et al. Co-culture of microalgae, cyanobacteria, and macromycetes for exopolysaccharides production: process preliminary optimization and partial characterization // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2012. — **167**, N 5. — P. 1092–1106.
- Ben-Amotz A. New mode of *Dunaliella* biotechnology: twophase growth for  $\beta$ -carotene production // Appl. Phycol. — 1995. — **7**. — P. 65–68.
- Borowitzka L.J., Borowitzka M.A. Commercial production of  $\beta$ -carotene by *Dunaliella salina* in open ponds // Bull. Mar. Sci. — 1990. — **47**. — P. 244–252.
- Bozhkov A.I., Menzyanova N.G. Age dependence of lipid metabolism and  $\beta$ -carotene content in cells of *Dunaliella viridis* Teod. // Hydrobiol. J. — 1997. — **33**, N 6. — P. 132–138.
- Bozhkov A.I., Menzyanova N.G., Kovalyova M.K. Annual rhythm of growth intensity of microalgal culture *Dunaliella viridis* Teod. (*Chlorophyta*) and fluctuations of some heliophysical factors // Intern. J. Algae. — 2008. — **10**, N 4. — P. 350–364.
- Bozhkov A.I., Menzyanova N.G., Kovalyova M.K. Seasonal peculiarities of the epigenotype formation in the copper-sensitive and copper-resistant strain of *Dunaliella viridis* Teod. in the process of accumulative cultivation // Ibid. — 2009. — **11**, N 2. — P. 128–140.
- Campenni L., Nobre B.P., Santos C.A. et al. Carotenoid and lipid production by the autotrophic microalga *Chlorella protothecoides* under nutritional, salinity, and luminosity stress conditions // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2013. — **97**, N 3. — P. 1383–1393.
- Christaki E., Bonos E., Giannenas I., Florou-Paneri P. Functional properties of carotenoids originating from algae // J. Sci. Food Agric. — 2012. [Epub ahead of print].
- Del Campo J.A., Garcha-González M., Guerrero M.G. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspective // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2007. — **74**, N 6. — P. 1163–1174.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. Calorimetric method for determination of sugars and related substances // Anal. Chem. — 1956. — **28**, N 3. — P. 350–356.
- Fang Y., Al-Assaf S., Phillips G.O. et al. Binding behavior of calcium to polyuronates: Comparison of pectin with alginate // Carbohydrate Polymers. — 2008. — **72**, N 2. — P. 334–341.
- Fiori E., Mazzotti M., Guerrini F., Pistocchi R. Combined effects of the herbicide terbuthylazine and temperature on different flagellates from the Northern Adriatic Sea // Aquat. Toxicol. — 2012. — **128–129C**. — P. 79–90.

- Garcia-Gonzalez M., Moreno J., Canavate J.P. et al.* Condition for open-air outdoor of *Dunaliella salina* in souther Spain // *Appl. Phycol.* – 2003. – **15**. – P. 177–184.
- Geun G.B., Baek G., Jin C.D. et al.* Characterization of a renewable extracellular polysaccharide from defatted microalgae *Dunaliella tertiolecta* // *Biores. Technol.* – 2012. – **129C**. – P. 343–350.
- Graziani G., Schiavo S., Nicolai M.A. et al.* Microalgae as human food: chemical and nutritional characteristics of the thermo-acidophilic microalga *Galdieria sulphuraria* // *Food Funct.* – 2013. – **4**, N 1. – P. 144–152.
- Horiuchi J., Ohba I., Tada K. et al.* Effective cell harvesting of halotolerant micoalgae *Dunaliella tartiolecta* with pH control // *Biosci. Bioeng.* – 2003. – **95**, N 4. – P. 412–415.
- Jeong B.E., Ko E.J., Joo H.G.* Cytoprotective effects of fucoidan, an algae-derived polysaccharide on 5-fluorouracil-treated dendritic cells // *Food Chem. Toxicol.* – 2012. – **50**, N 5. – P. 1480–1484.
- Jiang Y., Yoshida T., Quigg A.* Photosynthetic performance, lipid production and biomass composition in response to nitrogen limitation in marine microalgae // *Plant. Physiol. Biochem.* – 2012. – **54**. – P. 70–77.
- Lowry O.B., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall B.J.* Protein measurement with Folin phenol reagent // *Biol. Chem.* – 1957. – **93**. – P. 265–273.
- Micheletti E., Pereira S., Mannelli F. et al.* Sheathless mutant of cyanobacterium *Gloeotheca* sp. strain PCC 6909 with increased capacity to remove copper ions from aqueous solutions // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2008. – **74**, N 9. – P. 2797–2804.
- Mimouni V., Ulmann L., Pasquet V. et al.* The potential of microalgae for the production of bioactive molecules of pharmaceutical interest // *Curr. Pharm. Biotechnol.* – 2012. – **13**, N 15. – P. 2733–2750.
- Mohamed Z.A.* Polysaccharides as a protective response against microcystin-induced oxidative stress in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* and their possible significance in the aquatic ecosystem // *Ecotoxicology.* – 2008. – **17**, N 6. – P. 504–516.
- Paperi R., Micheletti E., De Philippis R.* Optimization of copper sorbing–desorbing cycles with confined cultures of the exopolysaccharide-producing cyanobacterium *Cyanospira capsulate* // *J. Appl. Microbiol.* – 2006. – **101**. – P. 1351–1356.
- Roleda M.Y., Slocombe S.P., Leakey R.J. et al.* Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy // *Biores. Technol.* – 2013. – **129**. – P. 439–449.
- Samorì G., Samorì C., Guerrini F., Pistocchi R.* Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a batch culture system in view of urban wastewater treatment: Pt I // *Water Res.* – 2013. – **47**, N 2. – P. 791–801.
- Soeder C.J.* Massive cultivation of microalgae: results and prospects // *Hydrobiologia.* – 1980. – **72**. – P. 197–209.
- Soontornchaiboon W., Joo S.S., Kim S.M.* Anti-inflammatory effects of violaxanthin isolated from microalga *Chlorella ellipsoidea* in RAW 264.7 macrophages // *Biol. Pharm Bull.* – 2012. – **35**, N 7. – P. 1137–1144.



- Tafresh A.H., Shariat M. Pilot culture of three strains of *Dunaliella salina* for  $\beta$ -carotene production in open ponds in the central region of Iran // Microbiol. & Biotechnol. – 2006. – **22**. – P. 1003–1006.
- Yang Z., Li J.J. Effects of abiotic factors on algal extracellular polysaccharides content // Ying Yong Sheng Tai Xue Bao. – 2008. – **19**, N 1. – P. 198–202.
- Yao C., Ai J., Cao X., Xue S., Zhang W. Enhancing starch production of a marine green microalga *Tetraselmis subcordiformis* through nutrient limitation // Biores. Technol. – 2012. – **118**. – P. 438–444.

Поступила 13 февраля 2013 г.  
Подписала в печать Е.И. Шнюкова

A.I. Bozhkov, E.I. Sysenko, N.G. Menzhanova, V.Yu. Kizilova

Research Institute of Biology, V.N. Karazin Kharkov National University,  
4, Svobody Sq., 61022 Kharkov, Ukraine  
e-mail: bozhkov@univer.kharkov.ua

DYNAMIC OF FUNCTIONAL EPIGENOTYPES *DUNALIELLA VIRIDIS* TEODOR.  
AT CUMULATIVE AND QUASICONTINUOUS CULTIVATION

The dynamics of *Dunaliella viridis* epigenotypes at cumulative and quasicontinuous cultivation was studied. It was found that the pattern of nucleic acids, proteins, triacylglycerides,  $\beta$ -carotene, which characterizes epigenotype depends on the conditions of cultivation of microalgae. Quasicontinuous cultivation of *D. viridis* can increase biomass yield by 23 % compared to the cumulative cultivation, with the specific productivity was 3 times less than the cumulative cultivation. It was found that the growth rate of the microalgae correlates with the accumulation exopolysaccharides in the culture medium.

**Key words:** *Dunaliella viridis*, epigenotype, biomass composition, cumulative cultivation, quasicontinuous cultivation.