

УДК 582.232:[581.143+577.122.5]

А.Б. БОРОВКОВ, И.Н. ГУДВИЛОВИЧ

Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского НАН Украины,
пр. Нахимова, 2, 99011 Севастополь, Украина
e-mail: spirit2000@ua.fm, gudirina2008@yandex.ru

ПОЛУПРОМЫШЛЕННОЕ ВЫРАЩИВАНИЕ *DUNALIELLA SALINA* ТЕОД. (*CHLOROPHYTA*) В ВОСТОЧНОЙ ЧАСТИ УКРАИНЫ

Проведена апробация двухстадийного культивирования *Dunaliella salina* с использованием квазинепрерывного метода выращивания. При переходе от непрерывного метода выращивания к накопительному и 10-кратном разбавлении культуры наблюдалось устойчивое повышение содержания каротиноидов в клетках дуналиеллы и соотношения кар./хл. *a*, что свидетельствует о перестройке пигментного аппарата, а также предшествует активному накоплению каротиноидов в клетках дуналиеллы.

Ключевые слова: *Dunaliella salina*, двухстадийное культивирование, квазинепрерывная культура.

Введение

Зелёная микроводоросль *Dunaliella salina* широко известна как один из наиболее перспективных природных источников β-каротина. Используемые в настоящее время промышленные технологии выращивания *D. salina* для получения β-каротина предусматривают, как правило, двухстадийное её культивирование. Ещё в 60-х годах XX в. Н.П. Масюк предложила двухэтапный метод культивирования *D. salina*, предусматривающий на первом этапе создание условий, способствующих накоплению биомассы микроводоросли, а на втором – условий, инициирующих накопление β-каротина в её клетках (Масюк, 1973). Данная технология выращивания, как и большинство известных к настоящему времени (Ben-Amotz, 1989; Lee, 2001), основана на методе периодических культур, который наиболее изучен и разработан. Актуальным на сегодняшний день является введение в технологическую схему промышленного выращивания *D. salina* менее распространённого квазинепрерывного способа культивирования. Он обеспечивает более высокую и стабильную продуктивность культуры, что экспериментально подтверждено лабораторными исследованиями (Боровков, 2008; Гудвиллович, 2012). Цель данной работы – апробация двухстадийного культивирования *D. salina* в полупромышленных условиях с использованием квазинепрерывного метода выращивания.

Материалы и методы

Работа выполнена на базе тепличного комплекса в Харьковской обл. в мае-июне 2013 г. Объект исследования – альгологически чистая культура *D. salina* (штамм IBSS-2) из коллекции культур ИнБЮМ НАНУ.

Для культивирования использовали модифицированную питательную среду Ben-Amotz (Боровков, 2008). Модификация заключалась в добавлении морской соли до концентрации в растворе 120 г·дм⁻³. Культиваторами служили прямоугольные бассейны 2 × 1 м. Объем культуры в каждом культиваторе составлял 200 л,

©А.Б. Боровков, И.Н. Гудвиллович, 2014

при высоте слоя раствора 10 см. Культуры постоянно перемешивали с помощью аквариумной помпы «Атман». Водоросли выращивали при естественном освещении. Погода в период эксперимента была облачная, с периодическими осадками. Среднесуточная температура культуральной среды 24 °С, рН 6–7.

Эксперимент проводили в два этапа. Первоначально культуру *D. salina* выращивали в квазинепрерывном режиме (5 сут), причём ежесуточный обмен составлял 10 % (скорость протока среды 0,1 сут⁻¹). На втором этапе, продолжавшемся 7 сут, использовали накопительный режим культивирования. Выросшую на первом этапе биомассу отбирали из бассейна и разбавляли в 5 и 10 раз. Разбавление проводили модифицированной средой без солей – источников азота и фосфора. Постепенно в течение суток повышали солёность в бассейнах до 240 г·дм⁻³.

Содержание сухого вещества (СВ), органического вещества (ОВ), относительное содержание хлорофилла *a* и суммарных каротиноидов определяли по: Гудвилович, 2012.

Результаты и обсуждение

На первом этапе эксперимента плотность культуры значительно не изменялась и находилась в пределах 0,59–0,68 г СВ·дм⁻³, т.е. культура фактически находилась в состоянии стационарного динамического равновесия с удельной скоростью роста 0,1 сут⁻¹ (рис. 1).

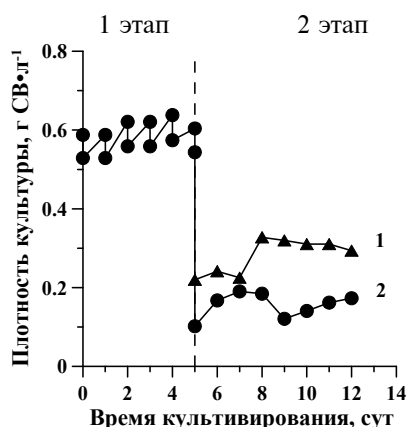


Рис. 1. Динамика плотности культуры при двухстадийном выращивании *Dunaliella salina*. Пунктирная линия – граница между непрерывным и накопительным режимами культивирования. Разбавление в 5 (1) и 10 раз (2)

Продуктивность культуры на первом этапе в среднем составила 6 г·м⁻²·сут⁻¹. На этой стадии роста культуры содержание пигментов варьировало в пределах 1,7–2,1 и 0,6–0,8 % ОВ – для хлорофилла *a* и каротиноидов соответственно, т.е. находилось в пределах, характерных для активно растущей «зелёной формы» *D. salina*.

На втором этапе после разбавления культуры наблюдали рост её плотности. Кроме того, в первые сутки происходило резкое снижение относительного содержания хлорофилла *a* и каротиноидов в клетках *D. salina* (рис. 2). В после-

дующие 6 сут относительное содержание хлорофилла *a* в клетках водоросли в двух вариантах эксперимента в среднем составляло 0,6–0,7 % ОВ. Содержание каротиноидов при разбавлении в 5 раз изменялось незначительно (0,2–0,3 % ОВ), а при 10-кратном разбавлении – постепенно увеличивалось (от 0,15 до 0,45 % ОВ) (см. рис. 2).

Продуктивность культуры *D. salina* по биомассе на первом этапе ($6 \text{ г} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сут}^{-1}$) была в 3 раза выше, чем на промышленных производствах Израиля и Испании (Ben-Amotz, 1995; García-González et al., 2003). Полученная продуктивность для региона восточной Украины достигнута без использования добавок углекислого газа в культуральную среду.

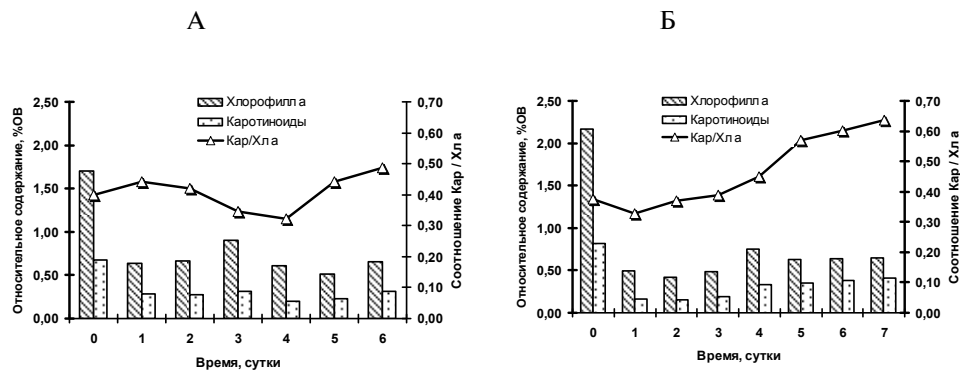


Рис. 2. Динамика относительного содержания хлорофилла *a*, каротиноидов и их соотношения. Разбавление культуры в 5 (А) и 10 раз (Б)

На втором этапе после разбавления культуры наблюдали рост её плотности, который обусловлен изменением световых условий и, по-видимому, остаточной концентрацией биогенных элементов в среде. Отмеченное в первые сутки после изменения условий резкое снижение относительного содержания пигментов, как правило, рассматривается исследователями как ответная реакция на одновременное скачкообразное изменение сразу нескольких факторов среды: концентрации биогенов, освещённости, рН, солёности и др. (Дробецкая, 2005). Причём в случае максимального разбавления воздействие данных факторов было более ярко выражено, так как содержание пигментов за первые сутки уменьшилось в 4,5 раза, тогда как в другом варианте опыта – в 2,5 раза.

По литературным данным, основными стрессовыми факторами для индукции синтеза β -каротина являются: комбинация высокой освещённости и дефицита биогенных элементов (Масюк, 1973; Боровков, 2008; Ben-Amotz, 1989, 1995; Lamers, 2010). На втором этапе после повышения освещённости в 5 и 10 раз (за счёт разбавления культуры) и повышения солёности среды в 2 раза индукции гиперсинтеза β -каротина не произошло. По-видимому, отрицательную роль сыграли погодные условия. Пасмурная погода на протяжении всего эксперимента не позволила достигнуть уровня необходимой освещённости для гиперсинтеза каротиноидов. Тем не менее, для варианта эксперимента с 10-кратным разведением, в котором влияние фактора освещённости и дефицита биогенных элементов в культуре было более выражено, чем при 5-кратном,

содержание каротиноидов и, соответственно, значение соотношения кар./хл. *a* имело стабильную тенденцию к повышению (от 0,4 в начале до 0,65 к окончанию эксперимента). Данный процесс свидетельствует о перестройке пигментного аппарата и обычно наблюдается перед активным накоплением каротиноидов в клетках дуналиеллы.

Заключение

Проведена апробация двухстадийного культивирования *Dunaliella salina* в полупромышленных условиях с использованием квазинепрерывного метода выращивания. Экспериментально показано, что в условиях естественного освещения (при пасмурной погоде) в данном регионе повышения освещённости за счёт разбавления культуры в 5–10 раз и повышения солёности культуральной среды в 2 раза оказалось недостаточно для интенсивного накопления каротиноидов. Тем не менее, при 10-кратном разбавлении наблюдалось устойчивое повышение соотношения кар./хл. *a*. Дальнейшее исследование по подбору условий и оптимизации перевода культуры *D. salina* от фазы активного роста к фазе накопления каротиноидов позволит разработать эффективную технологию получения в интенсивной культуре биомассы *D. salina*, обогащенной каротином.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Боровков А.Б. Динамика пигментов и роста микроводорослей в хемостате на примере *Dunaliella salina* Teod.: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Севастополь, 2008. – 28 с.
- Гудвилевич И.Н., Боровков А.Б. Ростовые и биохимические показатели квазинепрерывной культуры *Dunaliella salina* // Биотехнология. – 2012. – 5(3). – С. 105–111.
- Дробецкая И.В. Влияние условий минерального питания на рост и химический состав *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl.: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Севастополь, 2005. – 26 с.
- Масюк Н.П. Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода *Dunaliella* Teod. – Киев: Наук. думка, 1973. – 487 с.
- Ben-Amotz A. New mode of *Dunaliella* biotechnology: two-phase growth for β -carotene production // J. Appl. Phycol. – 1995. – 7. – P. 65–68.
- Ben-Amotz A., Shaish A., Avron M. Mode of action of the massively accumulated β -carotene of *Dunaliella bardawil* in protecting the algae against damage by excess irradiation // Plant. Physiol. – 1989. – 91(3). – P. 1040–1043.
- García-González M., Moreno J., Cañavate J.P. et al. Conditions for open-air outdoor culture of *Dunaliella salina* in southern Spain // J. Appl. Phycol. – 2003. – 15. – P. 177–184.
- Lamers P.P., Van de Laak C.C.W., Kaasenbrood P.S. et al. Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina* // Biotechnol. and Bioeng. – 2010. – 106(4). – P. 638–648.
- Lee Y.K. Microalgae mass culture system and methods: Their limitation and potential // J. Appl. Phycol. – 2001. – 13. – P. 307–315.

Подписал в печать П.М. Царенко

A.B. Borovkov, I.N. Gudvilovich

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of Southern Seas, NAS of Ukraine,
2, Nakhimov Av., 99011 Sevastopol, Ukraine
e-mail: spirit2000@ua.fm, gudirina2008@yandex.ru

PILOT-SCALE CULTIVATION OF *DUNALIELLA SALINA* TEOD. (*CHLOROPHYTA*) IN
THE EASTERN PART OF UKRAINE

The testing of two-stage system of industrial cultivation of *Dunaliella salina* with semicontinuous mode was carried out. After transition from continuous to the batch cultivation and 10-fold culture dilution steady increase in both the carotenoid content in *Dunaliella* cells, and the car./chl. *a* ratio was observed. This indicates restructuring of the pigment complex which is observed before the active carotenoids accumulation in *Dunaliella* cells.

Key words: *Dunaliella salina*, two-stage cultivation, semicontinuous culture.