Жилякова Т.А., Аристова Н.И., Ткачев И.Ф., Пилипенко Д.С. // Виноделие и виноградарство. – 2005. – № 2.– С. 26–27.

Рекомендовано к печати к.б.н. Палий А.Е.

ПРОДУКЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КВАЗИНЕПРЕРЫВНОЙ КУЛЬТУРЫ *PORPHYRIDIUM PURPUREUM* (BORY) ROSS ПРИ ЧАСТИЧНОМ ВОЗВРАТЕ СРЕДЫ

И.Н.ГУДВИЛОВИЧ, *кандидат биологических наук*;
С.Ю.ГОРБУНОВА, *кандидат биологических наук*;
А.С.ЛЕЛЕКОВ, *кандидат биологических наук*; А.Б.БОРОВКОВ
Институт биологии южных морей НАН Украины, г. Севастополь

Введение

Красная микроводоросль *Porphyridium purpureum* вызывает большой интерес у исследователей, так как является источником разнообразных биологически ценных веществ (фикобилипротеинов, внеклеточных сульфополисахаридов, ненасыщенных жирных кислот и др.) [9, 10, 12]. Так, пигмент В-фикоэритрин, относящийся к классу фикобилипротеинов, имеет широкие перспективы использования в пищевой, косметической и медицинской промышленности. Это обусловлено белковой природой, нетоксичностью данного пигмента, а также редко встречающимся оттенком красного цвета и ярко выраженной оранжевой флуоресценцией [3, 8, 11].

Культивирование *P. purpureum* в квазинепрерывном режиме способствует накоплению данного пигмента [1, 12], однако предполагает ежесуточный отбор и слив значительных количеств культуральной среды.

В связи с этим поставлена задача оценить возможность повторного использования культуральной среды при выращивании микроводоросли *P. purpureum* в квазинепрерывном режиме для снижения расходования химических реактивов, объемов сливаемой среды при сохранении или незначительном снижении продуктивности культуры.

Объекты и методы исследования

Объектом исследования являлась красная микроводоросль *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross (синоним *Porphyridium cruentum* Näg.) (штамм IBSS–70) из коллекции культур ИнБЮМ НАН Украины. Установка для культивирования состояла из пяти стеклянных фотобиореакторов плоскопараллельного типа объемом 6 л, осветителя – лампы ДРЛ–700, термостабилизирующей и газораспределительной систем. В процессе выращивания культура непрерывно снабжалась газовоздушной смесью с концентрацией углекислоты 2–3%, pH культуральной среды – 6–7 единиц. Освещенность рабочей поверхности культиваторов в среднем составляла 80 Вт/м^2, температура – 26–28°С. Водоросли выращивали на питательной среде Тренкеншу [6].

Культивирование осуществляли в квазинепрерывном режиме с удельной скоростью протока среды 0,2 сут$^{-1}$. Культиватор № 1 являлся контрольным, обмен в нем производили средой Тренкеншу с удвоенной концентрацией минерального азота и фосфора. На первом этапе эксперимента при обмене в культиваторах № 2–5 часть среды Тренкеншу заменяли супернатантом, полученным при центрифугировании соответствующего опытного варианта: № 2 – 20%, № 3 – 40%, № 4 – 60%, № 5 – 80%. На втором этапе (с 14 по 19 сут) режим культивирования был сохранен, но после осуществления обмена проводились допол-

нительные измерения концентрации минерального азота и фосфора. После этого содержание данных биогенных элементов в культиваторах № 2–5 корректировалось до уровня контрольного.

Рост культур регистрировали фотометрическим методом по оптической плотности культуры на длине волны 750 нм в кюветах с толщиной 0,5 см на КФК–2. Переход от единиц оптической плотности (D_{750}) к величине абсолютно сухой массы (АСМ), осуществляли посредством эмпирического коэффициента: $k = 0{,}68$ г·л$^{-1}$·ед.опт.пл$^{-1}$, $ACB = k \times D_{750}$ [2]. Содержание нитратного азота в среде определяли потенциометрическим методом с помощью иономера И–160М, минерального фосфора – по методу Морфи-Райли [4, 7]. Концентрацию В-фикоэритрина в водном экстракте определяли по [5].

Результаты и обсуждение

На протяжении двух этапов эксперимента динамика плотности культуры в первых трех вариантах (контроль, возврат культуральной среды 20 и 40%) статистически значимо не отличалась, причем плотность культуры в среднем составляла для первого этапа 2,3–2,5 г АСМ · л$^{-1}$, для второго – 1,2–1,4 г АСМ· л$^{-1}$ (рис. 1).

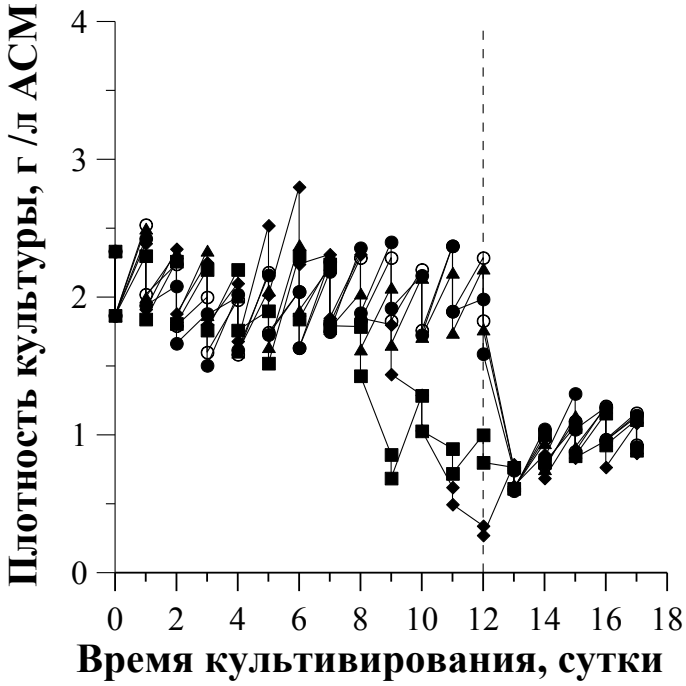


Рис. 1. Динамика плотности квазинепрерывной культуры *P. purpureum*: пунктирная линия отделяет первый и второй этапы эксперимента; ● – контроль, ○ – возврат среды 20%, ▲— возврат среды 40%, ■ – возврат среды 60%, ♦ – возврат среды 80%

Такую разницу по плотности культуры при неизменных внешних условиях выращивания можно объяснить понижением по техническим причинам концентрации углекислого газа в подаваемой газовоздушной смеси.

Для вариантов № 4–5 (возврат культуральной среды 60 и 80%) на первом этапе эксперимента наблюдалось лимитирование роста культуры *P. purpureum* (рис. 1) биогенными элементами (рис. 2). Для этих вариантов установлено статистически значимое снижение значений плотности культуры в два раза. На втором этапе отсутствовало лимитирование роста исследуемой микроводоросли минеральным

азотом и фосфором (рис. 2), поэтому плотность культуры в пяти вариантах отличалась незначительно.

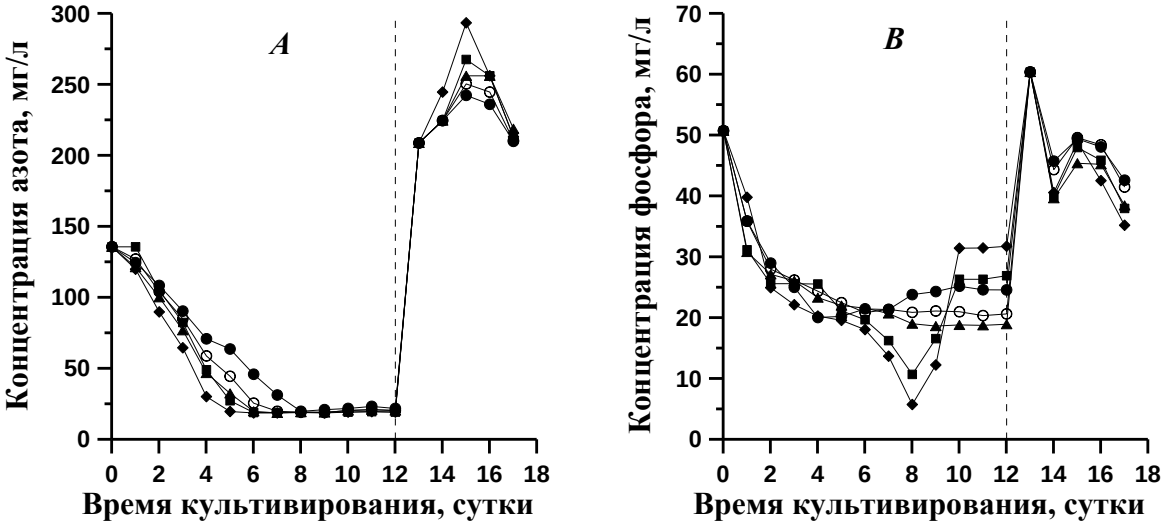


Рис. 2. Динамика минерального азота (*A*) и фосфора (*B*) в культуральной среде: пунктирная линия отделяет первый и второй этапы культивирования; ● – контроль, ○ – возврат среды 20%, ▲— возврат среды 40%, ■ – возврат среды 60%, ♦ – возврат среды 80%

Таким образом, экспериментально показано отсутствие выраженного влияния увеличения доли возвращаемой культуральной среды на плотность квазинепрерывной культуры *P. purpureum* при отсутствии лимитирования по минеральным элементам питания.

Для оценки влияния количества возвращаемой культуральной среды на накопление В-фикоэритрина было определено его среднее содержание в клетках за последние трое суток культивирования на обоих этапах эксперимента (рис. 3). С увеличением доли культуральной среды (от 0 до 80%), возвращаемой в культиватор при обмене, и пропорциональном снижении количеств вносимых биогенных элементов относительное содержание В-фикоэритрина в клетках *P. purpureum* на первом этапе снижается в 7,3 раза (от 9,6 до 1,3% АСМ). На втором этапе, при ежесуточной корректировке концентрации биогенных элементов до уровня контрольного варианта, относительное содержание В-фикоэритрина с увеличением доли среды, возвращаемой в культиваторы, снижалось в 1,7 раза (от 9,6 до 5,7% АСМ).

Рассчитана продуктивность культуры *P. purpureum* по биомассе и В-фикоэритрину на 1-м и 2-м этапах эксперимента (рис. 4). При увеличении доли возвращаемой культуральной среды (пропорциональном уменьшении количеств вносимых биогенных элементов) продуктивность культуры снижается, причем для В-фикоэритрина – в 8,4 раза (от 25 до 3 мг·л$^{-1}$·сут$^{-1}$), а для биомассы – в 2 раза (от 0,5 до 0,24 г·л$^{-1}$·сут$^{-1}$). Следовательно, режим, заданный на первом этапе эксперимента, не может быть рекомендован для получения биомассы *P. purpureum* с повышенным содержанием В-фикоэритрина.

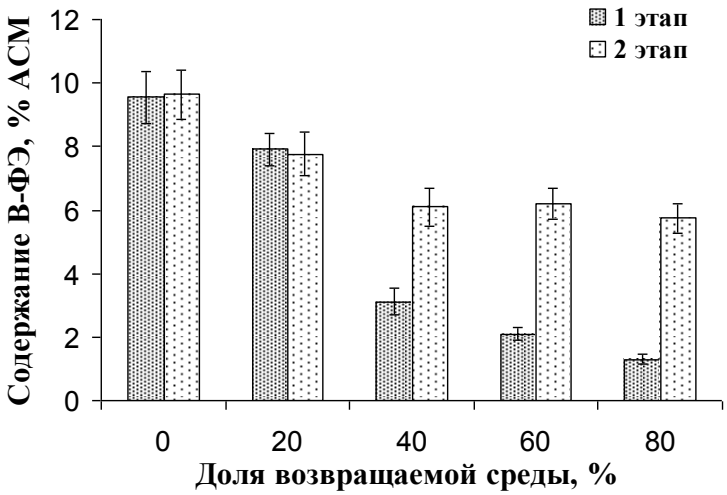


Рис. 3. Относительное содержание В-фикоэритрина в клетках *P. purpureum* на первом и втором этапах культивирования

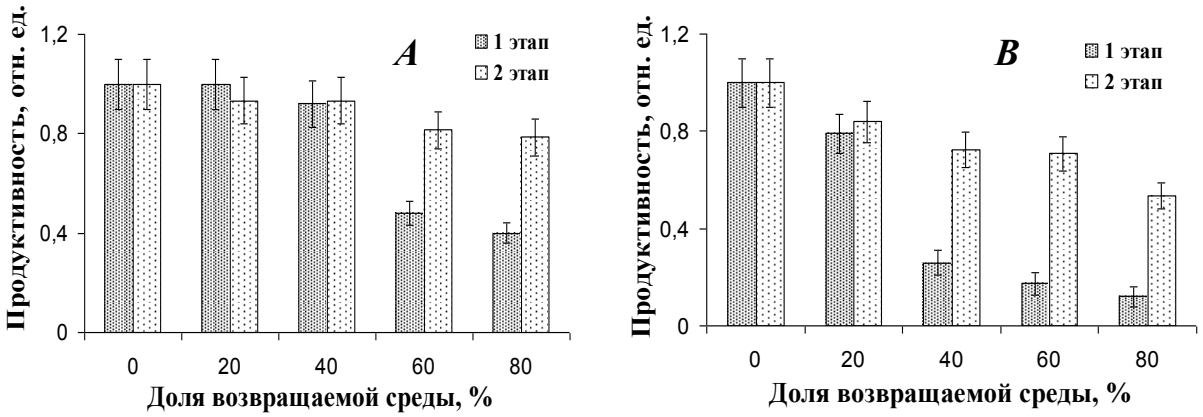


Рис. 4. Продуктивность квазинепрерывной культуры *P. purpureum* по биомассе (*A*) и В-фикоэритрину (*B*) на первом и втором этапах эксперимента (нормированная по контрольному варианту)

На втором этапе эксперимента продуктивность культуры *P. purpureum* по В-фикоэритрину уменьшается в среднем в 2 раза, причем при увеличении доли среды от 20 до 60% снижение продуктивности по сравнению с контрольным вариантом составляет 25%. При этих же условиях продуктивность *P. purpureum* по биомассе статистически значимо не изменяется.

Выводы

Экспериментальные исследования динамики плотности культуры *P. purpureum* и содержания В-фикоэритрина показали принципиальную возможность повторного использования культуральной среды, изымаемой в процессе квазинепрерывного культивирования.

Экспериментально показано отсутствие выраженного влияния увеличения количества возвращаемой среды на плотность и продуктивность квазинепрерывной культуры *P. purpureum* при отсутствии лимитирования по минеральным элементам питания. В этих же условиях продуктивность культуры *P. purpureum* по В-фикоэритрину с увеличением доли возвращаемой среды от 0 до 60% снижается на 25%.

Список литературы

1. Гудвилович И.Н., Лелеков А.С. Влияние различных концентраций минерального азота в среде на содержание В-фикоэритрина в клетках *Porphyridium cruentum* Nag. // Экология моря. – 2008. – Вып. 76. – С. 45–48.

2. Лелеков А.С. Моделирование роста и биосинтеза морских микроводорослей в квазинепрерывной культуре: Автореф. дисс. … канд. биол. наук / ИнБЮМ НАНУ. – Севастополь, 2009. – 26 с.

3. Лось С.И. Биохимические основы получения фикоэритрина из морских водорослей // Альгология. – 2008. – Т. 18, № 4. – С. 375–385.

4. Методы гидрохимических исследований основных биогенных элементов – М.: Изд-во ВНИРО, 1988. – 25 с.

5. Стадничук И.Н. Фикобилипротеины. Биологическая химия. – М.: Мир, 1990. – 196 с.

6. Тренкеншу Р.П. Ростовые и фотоэнергетические характеристики морских микроводорослей в плотной культуре: Автореф. дис. … канд. биол. наук / Ин-т физ. АН СССР. – Красноярск, 1984. – 28 с.

7. Уильямс У.Дж. Определение анионов. – М.: Химия, 1982. – С.134–136.

8. Arad S., Yaron A. Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics // Trends Food Sci. Technol. – 1992. – Vol. 3. – P. 92–97.

9. Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum* / M.R.Fuentes, G.A.Fernandez, J.S.Perez et al. // Food Chem. – 2000. – Vol. 70, №. 3. – P. 345–353.

10. Culture media optimization for growth and phycoerythrin production from *Porphyridium purpureum* / S.Kathiresan, R.Sarada, S.Bhattacharya et al. // Biotech. and Bioengin. – 2006. – Vol. 96. – P. 456–463.

11. SQDGs from *Porphyridium cruentum* inhibit the proliferation of human cancer cell-lines / Dumay J., Berge J.P., Debiton E. et al. // Marine biotechnology: an overview of leading fields. 9th ESMB meeting: European Society for Marine Biotechnology meeting, Nantes, 12 – 14 May 2002. – Actes Colloq. IFREMER. – 2003. – № 36. – P. 17–23.

12. Renewal rate of semicontinuous cultures of the microalga *Porphyridium cruentum* modifies phycoerythrin, exopolysaccharide and fatty acid productivity / J. Fabregas, D. Garcia, E. Morales et al. // J. Ferment. Bioeng. – 1998. – Vol. 86, № 5. – P. 477–481.

Рекомендовано к печати д.б.н. Рябушко Л.И.