

УДК 582.232/275.082.26

# ВЛИЯНИЕ ЭТАНОЛА НА СОСТАВ И ВЫХОД БИОМАССЫ *Dunaliella viridis* Teodor. ПРИ КВАЗИНЕПРЕРЫВНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

А. И. Божков  
Н. Г. Мензянова  
Е. И. Сысенко

НИИ биологии Харьковского национального университета  
имени В. Н. Каразина, Украина

E-mail: bozhkov@univer.kharkov.ua

Получено 04.07.2013

Исследовали влияние этанола (конечная концентрация 0,3 и 0,5%) на выход биомассы, ее состав (содержание нуклеиновых кислот, протеинов, липидов, хлорофиллов а и b, β-каротина и экзополисахаридов) и морфологию клеток *Dunaliella viridis* в режиме квазинепрерывного культивирования. Обнаружено, что добавление в среду культивирования этанола до конечной концентрации 0,3% увеличивало выход биомассы в 2 раза по сравнению с квазинепрерывным культивированием без этанола и в 2,5 раза по сравнению с накопительным культивированием. Повышение концентрации этанола в среде до 0,5% уменьшало выход биомассы *Dunaliella viridis* по сравнению с концентрацией 0,3%. Этанол увеличивал выход экзополисахаридов в среде, изменял морфологию и подвижность клеток *Dunaliella viridis*.

**Ключевые слова:** биомасса *D. viridis*, квазинепрерывное культивирование, влияние этанола.

Большинство задач биотехнологии сводится к получению метаболитов или цельной биомассы, которые находят применение в фармацевтической и пищевой промышленности, в решении проблем мониторинга и защиты окружающей среды.

Представители рода *Dunaliella* относятся к классу зеленых водорослей. Они содержат большое количество каротиноидов [1, 2], витаминов, протеинов и ненасыщенных жирных кислот [3–5]. Показано, что β-каротин *Dunaliella* в несколько раз эффективнее подавляет рост некоторых видов опухолей по сравнению с каротиноидами других растений [4].

Ныне ведутся работы по получению биотоплива из микроводорослей, поскольку некоторые их виды способны накапливать до 50% и более липидов [5, 6] и быть продуцентами водорода [7]. В настоящее время в мире ежегодно реализуется большой объем продукции, полученной из микроводорослей [8].

Однако при культивировании микроводорослей возникает проблема низкого выхода биомассы и нестабильности ее состава [8–9]. Это объясняется процессом адаптации, что проявляется в виде гетерогенности состава [10–11]. В связи с этим, имитируя «легкий

стресс» в процессе культивирования микроводорослей или других клеточных культур, можно, с одной стороны, «синхронизировать» качественный и количественный состав получаемой биомассы, а с другой — регулировать ее состав. В качестве индуктора такого «легкого стресса» для микроводорослей может выступать этанол [12–13].

В работе исследовали влияние последовательных многократных добавлений этанолов разной концентрации (0,3 и 0,5%) на интенсивность роста, морфологию и состав биомассы клеток *Dunaliella viridis* (содержание экзополисахаридов, нуклеиновых кислот, протеина, липидов, каротиноидов) в условиях квазинепрерывного культивирования.

## Материалы и методы

### Культивирование микроводорослей *Dunaliella viridis*

В экспериментах использовали альгологически чистую культуру одноклеточных зеленых микроводорослей *D. viridis* Teodor. var. *viridis* f. *euchlora*, штамм IBASU-A N29 (из коллекции культур водорослей Института ботаники НАН Украины, Киев).

Микроводоросли культивировали в среде Артари в условиях круглосуточного ос-

вещения (4 клк) при температуре 26–28 °С. Начальная плотность клеток для культур *D. viridis* составляла 1,3 млн кл/мл. Культивирование проводили в горизонтальных плоскопараллельных реакторах (9×39×27 см, объем клеточной суспензии — 1,5 л, толщина культурального слоя — 1,5 см), без дополнительного барботирования, но ежедневно механически перемешивали суспензию клеток (1 раз в сутки в течение 5–10 мин). Сразу после механического перемешивания клеточной суспензии отбирали аликвоты для определения концентрации клеток, содержания хлорофиллов и экзополисахаридов (ЭПС) в среде.

**Режимы культивирования. Накопительное культивирование (НК)**

Микроводоросли культивировали без отбора биомассы и добавления свежих порций культуральной среды до выхода на стационарный уровень.

**Квазинепрерывное культивирование (КНК)**

В этом режиме, начиная с 14-х сут, в середине экспоненциальной фазы роста, регулярно (каждые 7 сут) отбирали 50% клеточной суспензии и вносили такой же объем свежей среды Артари.

**Квазинепрерывное культивирование с регулярным добавлением этанола до конечной концентрации 0,3% (КНК 0,3) и 0,5% (КНК 0,5)**

В этих режимах, начиная с 14-х сут культивирования, регулярно (каждые 7 сут) отбирали 50% клеточной суспензии *D. viridis*, добавляли такой же объем свежей среды Артари и этанол до конечной концентрации 0,3% или 0,5% соответственно.

Для определения содержания хлорофиллов (а + b), нейтральных липидов и β-каротина клетки осаждали центрифугированием при 3 000 g, 20 мин. Осадок дважды промывали средой Артари для удаления экзометаболитов. Содержание хлорофиллов (а + b) определяли как описано в [15].

Нейтральные липиды и β-каротин разделяли методом тонкослойной хроматографии в системе гексан : диэтиловый эфир (4:1, v/v). Содержание нейтральных липидов устанавливали, как описано в [16]. Содержание β-каротина определяли на спектрофотометре СФ-46 (ЛОМО, Россия) и выражали в мкг/млн клеток, ДНК и РНК — по методу [17], в мкг/млн кл. Осадки после гидролиза нуклеиновых кислот растворяли в 1 N NaOH и определяли протеин по методу Лоури [18], содержание выражали в мкг/млн кл.

Из культуральных фильтратов, которые получали после осаждения клеток при 12 000 g, 15 мин, выделяли ЭПС по методу

[19]. Осадки ЭПС растворяли в 50 mM ЭДТА и определяли углеводы фенольным методом [20]. Содержание ЭПС выражали в мкг глюкозы/мл среды.

**Статистическая обработка**

Эксперименты были проведены троекратно в 3–4 биологических экспериментах для каждой экспериментальной точки. Достоверность различий устанавливали непараметрическим методом по U-критерию Манна-Уитни [21], стандартные ошибки средних — по методу [22].

## Результаты и обсуждение

**Влияние этанола на выход биомассы *D. viridis* при квазинепрерывном культивировании**

В течение 56 сут квазинепрерывного культивирования *D. viridis* с одного реактора получали 3 г сухой биомассы. Удельная продуктивность (УП) при этом составила 0,5 г/л (табл. 1). В том случае, когда в культуру вносили этанол до конечной концентрации 0,3%, выход сухой биомассы составил 6,2 г с реактора при УП 1 г/л (табл. 1). Увеличение концентрации этанола в среде культивирования до 0,5% уменьшало выход биомассы и УП. Следует отметить, что, если культура росла все 56 сут в накопительном режиме, и сбор биомассы осуществлялся не каждые 7 сут, как в случае КНК, а один раз на 56-е сут роста, то выход сухой биомассы составлял только 2,5 г с одного реактора при удельной продуктивности 1,6 г/л.

Следовательно, добавление в среду культивирования этанола до конечной концентрации 0,3% увеличивало выход биомассы при квазинепрерывном культивировании и удельную продуктивность в 2 раза. При этом выявлена дозовая зависимость, т. е. дальнейшее увеличение концентрации этанола до 0,5% повышало эти показатели в меньшей степени по сравнению с концентрацией 0,3%.

**Таблица 1. Выход сухой биомассы микроводорослей *D. viridis* и удельная продуктивность при разных режимах культивирования**

Режим культивирования	Б/м, г/реактор	Удельная продуктивность, г/л
КНК	3,08±0,33	0,51±0,08
КНК 0,3	6,28±0,65*	1,05±0,14*
КНК 0,5	5,69±0,64*	0,95±0,13*

*Примечание.* \* —  $P < 0,05$  между КНК и КНК 0,3 и КНК 0,5 при культивировании в течение 56 сут.

Поскольку этанол вносили в культуру многократно, каждые 7 сут, представляло интерес оценить динамику выхода биомассы.

Было обнаружено, что, если начиная с 14 сут (середина экспоненциальной фазы роста культуры в условиях реактора) при 6 млн. клеток/мл отбирать 50% культуры, то за последующие 7 сут восстанавливалось исходное количество клеток (рис. 1). Такой цикл восстановления популяции клеток сохранялся на протяжении 56 сут культивирования, хотя и наблюдалась некоторая тенденция к постепенному уменьшению количества клеток (рис. 1).

В том случае, если в культуру при каждом последующем отборе биомассы вместе со средой культивирования вносили этанол до конечной концентрации 0,3%, количество клеток увеличивалось после первого добавления на 2 млн/мл по сравнению с контролем, а после второго добавления — до 16 млн/мл, что соответствовало их количеству при накопительном культивировании (рис. 1). Однако после 5-го и 6-го добавления этанола количество клеток не восстанавливалось (рис. 1). Практически такой же временной эффект влияния этанола сохранялся и после внесения в среду культивирования 0,5% этанола, однако количественно он был выражен в меньшей степени (рис. 1).

Поскольку интенсивность роста микроводорослей в значительной степени зависит от фотосинтетической активности, на следующем этапе определяли динамику содержания хлорофиллов а и в.

*Влияние этанола на содержание хлорофиллов а и в в режиме квазинепрерывного культивирования*

Содержание хлорофиллов а и в в клетках *D. viridis* при культивировании в накопительном режиме увеличивалось до выхода

на стационарную фазу роста и в дальнейшем незначительно снижалось (рис. 2).

В случае КНК содержание хлорофиллов после первых 3 сут 50%-го отбора биомассы клеток уменьшалось и далее оставалось достоверно ниже накопительного уровня (рис. 2). Этот показатель совпадает с относительно низкой интенсивностью роста *D. viridis* при КНК.

Добавление этанола в среду культивирования при КНК сопровождалось увеличением содержания хлорофиллов в клетках *D. viridis* после первого добавления по сравнению с КНК без этанола, но в дальнейшем после 3 и особенно 4 добавлений уменьшалось и было значительно ниже их содержания по сравнению с КНК без этанола (рис. 2).

*Влияние этанола на динамику содержания экзополисахаридов *D. viridis* в условиях КНК*

В процессе жизнедеятельности клетки микроводорослей выделяют в среду разнообразные экзометаболиты, среди которых важное место занимают полисахариды. Было обнаружено, что за время культивирования *D. viridis* в режиме КНК за 56 сут можно получить 35 мг полисахаридов с реактора с удельным выходом 6,5 мг/л (табл. 2). Если культивирование осуществлялось с многократным последовательным добавлением этанола до концентрации 0,3%, выход ЭПС был в 2,6 раза, а УП в 2,4 раза больше (табл. 2).

Добавление в среду большей концентрации (0,5%) сопровождалось увеличением содержания ЭПС в культуральной среде в 3, а УП — в 2,7 раза (табл. 2). Полученные результаты позволяют заключить, что этанол влияет на экскреторную активность клеток *D. viridis*, и это в какой-то мере может отражать изменение всего состава биомассы.

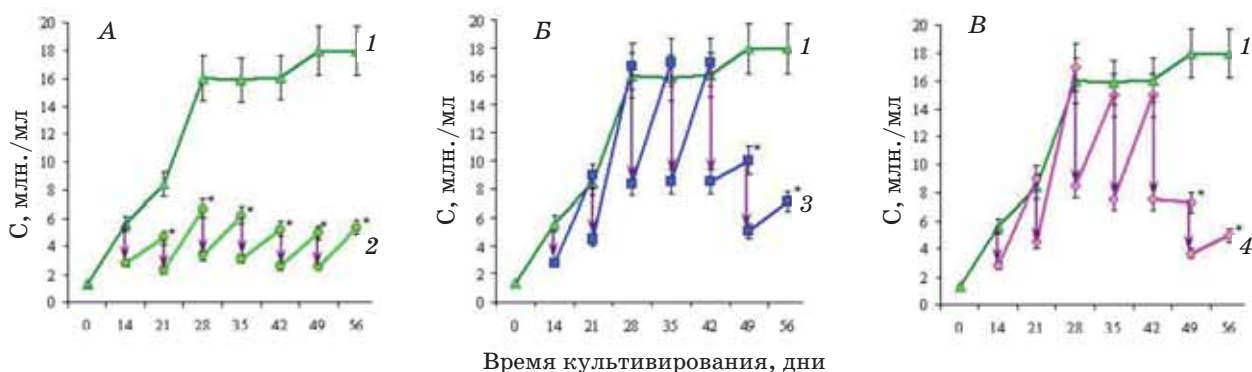


Рис. 1. Количество клеток *D. viridis* при: накопительном культивировании (1), квазинепрерывном (2), квазинепрерывном после многократных последовательных добавлений этанола (указано стрелками) до конечной концентрации этанола 0,3 (3) и 0,5% (4).

Здесь и далее: \* —  $P < 0,05$  между накопительным и квазинепрерывным культивированием



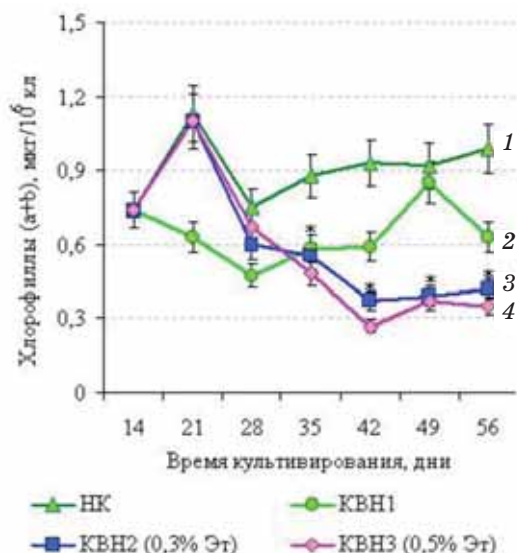


Рис. 2. Содержание хлорофиллов (a + b) в клетках *D. viridis* в различных условиях культивирования:

1 — накопительное культивирование; 2 — КНК; 3 — КНК 0,3; 4 — КНК 0,5.

Таблица 2. Суммарный выход ЭПС (мг глюкозы/реактор) и УЭ ЭПС (мг глюкозы/л) в культуре микроводорослей *D. viridis* при различных режимах культивирования

РК	Выход ЭПС, мг глюкозы/реактор	УЭ ЭПС, мг глюкозы/л
КНК 1	35,0±5,3	6,5±1,1
КНК 0,3	94,2±17,5*	15,7±3,0*
КНК 0,5	104,1±16,4*	17,8±2,6*

Влияние этанола на состав биомассы *D. viridis* на 56-е сут квазинепрерывного культивирования

Состав биомассы *D. viridis* определяли на 56-е сут культивирования. Было обнаружено, что состав биомассы, полученной в присутствии этанола, отличался по соотношению основных метаболитов (нуклеиновых кислот, протеинов, липидов и пигментов) по сравнению с контролем. При этом он был разным в зависимости от концентрации этанола (рис. 3).

Так, содержание ДНК в биомассе, полученной при культивировании с 0,3%-м этанолом, было увеличено в 2,2 раза, а при 0,5%-м — в 2,7 раза.

В такой же степени было увеличено и содержание РНК (рис. 3).

Содержание протеина не изменялось по сравнению с контролем при концентрации

этанола 0,3% и было увеличено в 2 раза при концентрации 0,5% (рис. 3). Содержание эфиров стероидов увеличивалось в 2 раза только при концентрации этанола 0,5%. В то же время содержание ТГ возрастало при меньшей концентрации в 2 раза (рис. 3).

Различные изменения исследуемых показателей при разных концентрациях этанола в среде культивирования может указывать на различие в пороге чувствительности протеинового, липидного и нуклеинового обмена у *Dunaliella*.

Содержание β-каротина в присутствии этанола существенно уменьшалось. Если в контрольной культуре при квазинепрерывном культивировании его содержание составляло  $8,3 \pm 1,2$  мкг/10<sup>8</sup> клеток *D. viridis*, то в присутствии 0,3%-го этанола уменьшалось в 2,1 раза, а при конечной концентрации 0,5% он не выявлялся в клетках *D. viridis* (рис. 3).

Следовательно, присутствие этанола в среде культивирования сопровождается не только изменением скорости накопления биомассы *D. viridis*, но и составом биомассы (рис. 3).

Морфология клеток *D. viridis* при разных режимах культивирования

Влияние многократного добавления этанола на интенсивность роста, состав биомассы, активность экскреции ЭПС свидетельствует о том, что этанол индуцирует глубокие перестройки метаболизма микроводорослей. Необходимо было определить возможную взаимосвязь этих метаболических изменений с морфологией клеток.

Ранее нами было высказано предположение о том, что кооперативные перестройки эпигенотипа могут происходить не линейно, а дискретными структурно-морфологическими изменениями на уровне структу-

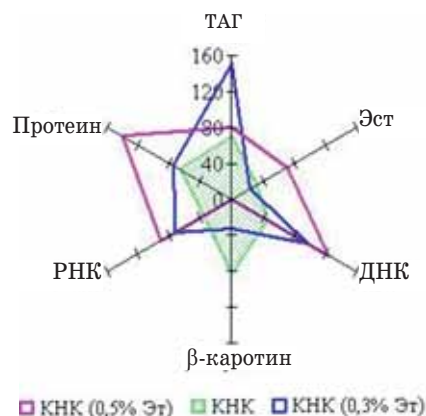


Рис. 3. Состав биомассы *D. viridis* на 56-е сут роста при различных режимах накопительного культивирования:

ТАГ — триацилглицериды; Эст — эфиры стероидов

рообразующих компонентов клетки (мембранный цитоскелет, соединительная ткань и др.) [23].

Известно, что в лабораторной культуре и в природных биотопах для клеточной популяции *D. viridis* характерна высокая морфологическая гетерогенность: клетки различаются по размерам и форме (соотношение большого и малого диаметра) [24]. Кроме того, морфологические классы *D. viridis* характеризуются различной двигательной активностью, что может отражать различия в интенсивности метаболизма и, в частности, синтеза АТФ.

В условиях квазинепрерывного культивирования на 56-е сут роста клетки по форме и размерам были достаточно разнообразны. Если представить их как морфологические классы относительно диаметров  $d1/d2$  и  $S$ , то таких основных можно выделить 6–8 (рис. 4). В том случае, если культуры росли на среде с этанолом, то на 56-е сут они были представлены двумя основными классами по площади и все были округлыми и неподвижными ( $d1/d2 = 1$ ). Такие морфологические перестройки клеток *D. viridis* не зависели от концентрации этанола в среде (рис. 4).

Следовательно, на поздних этапах КНК после 6-го добавления этанола, когда численность клеток микроводорослей резко снижалась, формировалась специфическая структура популяции микроводорослей — 95% клеток были неподвижны и имели округлую форму. Характерной особенностью биомассы микроводорослей на этом этапе культивирования (56-е сут) было высокое содержание ДНК и РНК, низкое —  $\beta$ -каротина и увеличенное — протеина.

Полученные результаты показали, что этанол может быть использован как неспецифический регулятор пролиферативной и метаболической активности *D. viridis*. Био-

логический эффект этанола зависит не только от конечной концентрации в среде культивирования, но и от схемы его добавления.

Механизм действия этанола на растительные клетки практически не исследован. Однако его действие на метаболизм животных клеток изучено. У них этанол увеличивал интенсивность синтеза ДНК на 38%, в клетках регенерирующей печени индуцировал синтез мРНК, кодирующей уникальный протеин с м. м. 47 кДа [25].

Хроническое введение этанола приводило к уменьшению содержания глутатиона в митохондриях и увеличивало продукцию свободных радикалов [26]. Известно, что он оказывает выраженное действие на метаболизм липидов [27].

Учитывая данные нашей работы, можно предположить, что этанол проявляет полифункциональное действие на метаболизм не только животных, но и растительных клеток. Можно выделить несколько стадий или этапов его дозозависимых эффектов. На первой стадии биологического действия, после первого добавления в относительно небольшой концентрации, он используется как дополнительный источник углерода, что выражается во включении  $^{14}\text{C}$ -этанола в состав ДНК, РНК, протеинов и других молекул [13]. В то же время он может специфически стимулировать ряд метаболических процессов, в частности увеличивать содержание хлорофилла, протеинов и других соединений. Это проявлялось в усилении пролиферации клеток (количество клеток увеличивалось до 16 млн/мл по сравнению с 8–10 в контроле). На второй стадии действия после 3–4 последовательных добавлений этанол проявлял стабилизирующий эффект поддержания исследуемых показателей на относительно постоянном уровне.

На третьей стадии, после 5–6 последовательных добавлений наблюдается его

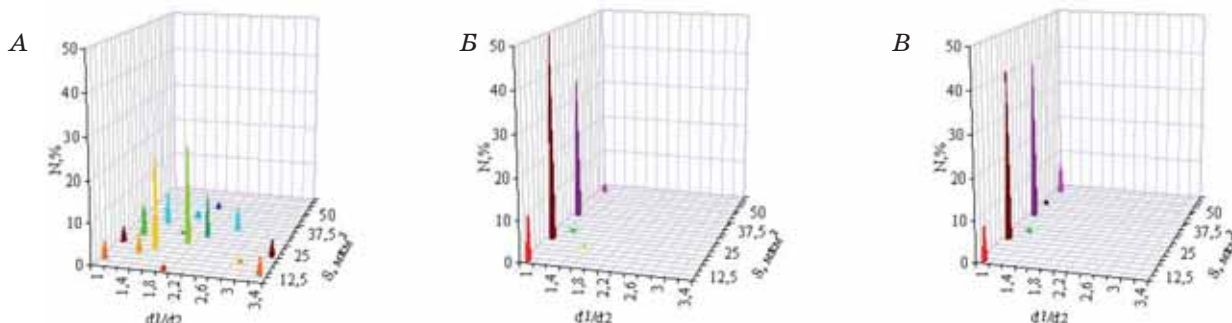


Рис. 4. Распределение морфологических классов в клеточной популяции микроводорослей *D. viridis* в различных условиях культивирования на 56-е сут:

А — квазинепрерывное культивирование;

Б — квазинепрерывное культивирование с добавлением этанола до конечной концентрации 0,3%;

В — квазинепрерывное культивирование с добавлением этанола до конечной концентрации 0,5%

токсический эффект: ингибируется интенсивность пролиферации, уменьшается содержание хлорофилла и особенно каротиноидов. Клетки теряют подвижность и округляются. Эта реакция может индуцировать половое размножение *D. viridis*. Временной характер проявления стадий биологического действия зависит от конечной концентрации этанола.

Таким образом, полученные результаты показали, что внесение в среду культивирования *D. viridis* этанола до конечной концентрации 0,3% увеличивало выход биомассы *D. viridis* в 2 раза. Однако после многократных последовательных добавлений продуктивность уменьшалась, а после 5–6, с семидневным интервалом, культура погибала; присутствие этанола

в среде культивирования приводит к изменению состава биомассы *Dunaliella*: увеличению содержания ДНК, РНК и триацилглицеридов и уменьшению или полной потере  $\beta$ -каротина. Изменение состава биомассы микроводорослей зависит от концентрации этанола в среде; добавление его до конечной концентрации 0,3 и 0,5% сопровождалось увеличением интенсивности экскреции полисахаридов, потерей подвижности клеток *Dunaliella* и изменением их формы на округлые. При многократных добавлениях этанола возможно существование нескольких стадий его биологического действия: стимуляции, адаптации и гибели. Скорость их прохождения зависит от конечной концентрации этанола.

### REFERENCES

1. Jones C. S., Mayfield S. P. Steps toward a globally available malaria vaccine: Harnessing the potential of algae for future low cost vaccines. *Bioengineered*. 2013, 4(3), 164–167.
2. Tran M., Van C., Barrera D. J., Pettersson P. L., Peinado C. D., Bui J., Mayfield S. P. Production of unique immunotoxin cancer therapeutics in algal chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013, 110(1), E15–22.
3. Varvas K., Kasvandik S., Hansen K., Järving I., Morell I., Samel N. Structural and catalytic insights into the algal prostaglandin H synthase reveal atypical features of the first non-animal cyclooxygenase. *Biochim. Biophys. Acta*. 2013, 1831(4), 863–871.
4. Raja R., Hemaiswarya S., Balasubramanyam D., Rengasamy R. Protective effect of *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyta) against experimentally induced fibrosarcoma on wistar rats. *Microbiol. Res.* 2007, 162(2), 177–184.
5. Taylor R. L., Rand J. D., Caldwell G. S. Treatment with algae extracts promotes flocculation, and enhances growth and neutral lipid content in *Nannochloropsis oculata* — a candidate for biofuel production. *Mar. Biotechnol. (NY)*. 2012, 14(6), 774–781.
6. Doshi R., Nguyen T., Chang G. Transporter-mediated biofuel secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013, 110(19), 7642–7647.
7. Scoma A., Giannelli L., Faraloni C., Torzillo G. Outdoor H<sub>2</sub> production in a 50-L tubular photobioreactor by means of a sulfur-deprived culture of the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biotechnol.* 2012, 157(4), 620–627.
8. Bumbak F., Cook S., Zachleder V., Hauser S., Kovar K. Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011, 91(1), 31–46.
9. Xu L., Weathers P. J., Xiong X. R., Liu C. Z. Microalgal bioreactors: Challenges and opportunities. *Eng. Life Sci.* 2009, 9(3), 178–189.
10. Bozhkov A. I., Menzyanova N. G., Kovalyova M. K. Seasonal peculiarities of the epigenotype formation in the copper-sensitive and copper-resistant strains of *Dunaliella viridis* Teod. in the process of accumulative cultivation. *Int. J. Algae*. 2009, 11(2), 128–140.
11. Bozhkov A. I., Kovalyova M. K., Menzyanova N. G. Is it possible to “cancel” aging process of cell culture under optimal conditions for cultivation? *Adv. of gerontology*. 2011, 24(1), 26–37. (In Russian).
12. Menzyanova N. G., Bozhkov A. I., Sotnik N. N. Effect of ethanol growth dynamics and metabolism of triacylglycerides and  $\beta$ -carotene of *Dunaliella viridis* Teod. *Algologia*. 2002, 12(2), 195–206. (In Russian).
13. Bozhkov A. I., Menzyanova N. G. Effect of ethanol on metabolism of algae. metabolism of nucleic acids and protein in cell of *Dunaliella viridis* Teod. *Algologia*. 2002, 12(3), 300–308. (In Russian).
14. Bozhkov A. I., Menzyanova N. G. Age dependence of lipid metabolism and -carotene content in cells of *Dunaliella viridis* Teod. *Hydrobiol. J.* 1997, 33(6), 132–138.
15. Gavrilenko V. F., Ladygina M. E., Khandobina L. M. Large workshop on plant physiology. Moscow: Vysshaya shkola. 1975, 127 p. (In Russian).
16. Griбанov G. A., Sergeev S. A. Express microanalysis total lipids blood serum and their fractions. *Voprosy Medicinskoj Khimii*. 1975, V. 26, 652–655. (In Russian).
17. Spirin A. S. Spectrophotometric determination of the total amount of nucleic acid. *Biochemistry*. 1958, V. 23, 656–662. (In Russian).
18. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the



- Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193(1), 265–275.
19. Horiuchi J., Ohba I., Tada K. et al. Effective cell harvesting of halotolerant microalgae *Dunaliella tertiolecta* with pH control. *Biosci. Bioeng.* 2003, 95(4), 412–415.
  20. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. F., and Smith Fred. Calorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 1956, 28(3), 350–356.
  21. Gubler E. V., Genkin A. A. Application of nonparametric criteria statistics in biomedical researches. *Leningrad: Medicine, Leningradskoe otdelenie.* 1973, 141 p. (In Russian).
  22. Lakin G. F. Biometrics. *Moscow: Vysshaya shkola.* 1990, 293 p. (In Russian).
  23. Bozhkov A. I., Nikitchenko Yu. V., Sidorov V. I., Kurguzova N. I., and Klimova E. M. Gormesis model of metabolic memory and possibility of regulation of the rate of aging. *Problemy stareniya i dolgoletiya.* 2012, 21(3), 245–254. (In Russian).
  24. Bozhkov A. I., Goltvyanskiy A. V. Functional heterogeneity of cells *Dunaliella viridis* Teod. (Chlorophyta) and sensitivity to copper sulfate. *Algologia.* 2000, 10(1), 22–31. (In Russian).
  25. Zhang M., Gong Y., Corbin I., Mellon A., Choy P., Uhanova J., Minuk G. Y. Light ethanol consumption enhances liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Gastroenterology.* 2000, 119(5), 1333–1339.
  26. Fernandez-Checa J. C., Kaplowitz N., Garcia-Ruiz C., Colell A., Miranda M., Mari M., Ardite E., Morales A. GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *Am. J. Physiol.* 1997, 273(1 Pt 1), G7–17.
  27. Neuman M. G. First international symposium on the molecular pathology and clinical aspects of the inflamed liver: alcohol and cytokines. *Clin. Invest. Med.* 1998, 21(6), 283–287.

#### ВПЛИВ ЕТАНОЛУ НА СКЛАД ТА ВИХІД БІОМАСИ *Dunaliella viridis* Teodor. ЗА КВАЗІНЕПЕРЕРВНОГО КУЛЬТИВУВАННЯ

A. I. Божков  
Н. Г. Мензянова  
Є. І. Сисенко

НДІ біології Харківського національного  
університету імені В. Н. Каразіна, Україна

E-mail: bozhkov@univer.kharkov.ua

Досліджували вплив етанолу (кінцева концентрація 0,3 і 0,5 %) на вихід біомаси, її склад (вміст нуклеїнових кислот, протеїнів, ліпідів, хлорофілів а і b, β-каротину і екзополісахаридів) та морфологію клітин *Dunaliella viridis* у режимі квазінеперервного культивування. Виявлено, що додавання до середовища культивування етанолу до кінцевої концентрації 0,3 % збільшувало вихід у 2 рази порівняно з квазінеперервним культивуванням без етанолу і в 2,5 рази порівняно з накопичувальним культивуванням. Збільшення концентрації етанолу в середовищі до 0,5 % зменшувало вихід біомаси *Dunaliella viridis* порівняно з концентрацією 0,3 %. Етанол збільшував вихід екзополісахаридів у середовищі та змінював морфологію і рухливість клітин *Dunaliella viridis*.

**Ключові слова:** біомаса *D. viridis*, вплив етилового етанолу, квазінеперервне культивування.

#### INFLUENCE OF ETHANOL ON COMPOSITION AND OUTPUT OF BIOMASS OF *Dunaliella viridis* Teodor. IN QUASI-CONTINUOUS CULTIVATION

A. I. Bozhkov  
N. G. Menzyanova  
E. I. Sysenko

Research Institute of Biology of Karazin  
Kharkiv National University, Ukraine

E-mail: bozhkov@univer.kharkov.ua

The effect of ethanol (final concentration is 0.3 and 0.5%) on biomass yield and composition (content of nucleic acids, proteins, lipids, and chlorophyll a and b, β-carotene, and exopolysaccharides) and morphology of the cells *Dunaliella viridis* in a quasi-mode of cultivation was investigated. It has been found that addition of ethanol in the culture medium to a final concentration of 0.3% increased output 2-fold compared with the quasi-continuous cultivation without alcohol and 2.5 times compared with a cumulative cultivation. Increasing the concentration of ethanol in the medium to 0.5% reduced the biomass yield of *Dunaliella viridis* compared with 0.3% alcohol concentration. Ethanol increased the output exopolysaccharides into culture medium and changed morphology and *Dunaliella viridis* motility.

**Key words:** *D. viridis* biomass, quasi-continuous cultivation, effect of ethanol.