

УДК 582.232:[581.143+577.122.5]

А. Б. Боровков, И. Н. Гудвилевич

**ИНТЕНСИВНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ *DUNALIELLA SALINA* КАК СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИОМАССЫ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ β -КАРОТИНА.
СООБЩЕНИЕ 1. ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

Проведена сравнительная оценка влияния различных физико-химических факторов среды на накопление β -каротина в интенсивной культуре *Dunaliella salina*. Показано преобладающее влияние светового обеспечения над стрессовым воздействием температуры, солености и экспозиции на накопление β -каротина.

Ключевые слова: *Dunaliella salina*, интенсивное культивирование, световые условия, β -каротин, продуктивность.

Зеленая эвригалобная микроводоросль *Dunaliella salina* — уникальный организм, способный выдержать широкую амплитуду экстремальных значений различных абиотических факторов [1, 8, 21, 25]. Общеизвестно, что *D. salina* в определенных условиях способна к гиперсинтезу β -каротина. Его содержание может достигать более 10% сухой массы водорослей [15, 16, 17], что является наиболее высоким показателем по сравнению с другими продуцентами β -каротина [2]. Это позволяет считать микроводоросль *D. salina* наиболее перспективным источником β -каротина для биотехнологической промышленности. β -каротин, который получают из растительного сырья, не токсичен. Будучи сильнейшим антиоксидантом, он оказывает антимуtagenное, радиопротекторное и противоопухолевое действие, таким образом замедляя старение организма [5, 14, 19].

На сегодняшний день в лабораторных условиях получены высокие показатели продуктивности и отработаны режимы интенсивного культивирования *D. salina* [3, 4, 7] для наращивания существенного количества биомассы.

В современной научной литературе также широко представлены результаты исследования накопления β -каротина в клетках *D. salina* в различных условиях ее культивирования [3, 6, 10, 16, 20, 22—24, 27]. Исследование влияния различных физико-химических факторов среды на накопление β -каротина культурой *D. salina* остается актуальным и в наши дни. Представленные в литературе сведения очень разнородны, не систематичны и иногда противоречивы. Кроме того, практически отсутствуют данные для интен-

© А. Б. Боровков, И. Н. Гудвилевич, 2015

сивных культур *D. salina*. Это предопределило цель исследования — провести сравнительную оценку влияния различных физико-химических факторов на накопление и выход β -каротина в интенсивной культуре *D. salina*.

Материал и методика исследований. Объект исследования — зеленая эвригалобная микроводоросль *Dunaliella salina* Teod. (штамм IBSS-1) из коллекции культур ИнБЮМ.

Установка для культивирования микроводорослей состояла из шести стеклянных фотобиореакторов плоскопараллельного типа объемом 6 л с рабочей толщиной 5 см, осветителя — лампы ДРЛ-700, термостабилизирующей и газораспределительной систем. Объем суспензии в каждом культиваторе поддерживали на уровне 5 л.

Эксперимент проводили в два этапа: первоначально культуру *D. salina* выращивали в накопительном режиме на модифицированной питательной среде Тренкеншу [12], при приготовлении которой использовали морскую соль до концентрации в растворе 120 г/дм³ [3]. Первый этап культивирования длился до стационарной фазы роста и истощения в среде элементов минерального питания. На этом этапе освещенность рабочей поверхности культиваторов составляла 80 Вт/м², температура — 26—28°C, pH культуральной среды — 6—7 единиц. В процессе выращивания культура непрерывно снабжалась газо-воздушной смесью с концентрацией углекислоты 3% по объему.

Далее, выросшую биомассу из всех экспериментальных культиваторов смешали и распределили вновь по культиваторам. Таким образом, получили во всех вариантах культуру одинаковой плотности, равной 4,8 г/дм³. В варианте эксперимента № 3 культуру дополнительно разбавили в 10 раз дистиллированной водой с добавлением морской соли до концентрации 120 г/дм³. В культиваторы № 1 и 2 дополнительно внесли 120 г/дм³ морской соли (табл. 1). На этой стадии эксперимента изменяли освещенность рабочей поверхности культиваторов, которая составляла 200 и 80 Вт/м², температуру — 35 и 28°C, концентрацию морской соли — 240 и 120 г/дм³. Кроме того, в некоторые культиваторы дополнительно вносили незначительное количество элементов минерального питания, что, по литературным данным, способствует адаптации культуры к стрессовым условиям среды и снижает долю отмерших клеток [11]. При проведении эксперимента в вариантах 1 и 3 вносили 0,059 г N/дм³, 0,012 г P/дм³ и микроэлементы в виде солей из прописи среды по Тренкеншу [12] (табл. 1).

Плотность культуры, а также содержание сухого вещества (СВ) определяли объемно-массовым [13], а также фотометрическим методом [3, 9]. Массовую долю зольного остатка в сырой биомассе микроводорослей определяли путем предварительного высушивания навесок при 105°C в течение 24 ч и последующего сжигания в муфельной печи при $t = 500^\circ\text{C}$ до постоянной массы [9]. Определяемые показатели химического состава выражали в пересчете на органическое вещество (ОВ), вычитая из значения СВ массу зольного остатка. Содержание суммарных каротиноидов определяли спектрофотометрическим методом [9]. Пигменты экстрагировали из клеток микро-

1. Условия проведения 2-й стадии культивирования *Dunaliella salina* на модифицированной среде Тренкеншу

Параметры	Варианты эксперимента					
	1	2	3	4	5	6 (контроль)
Начальная плотность культуры, г/дм ³	4,8 ± 0,2	4,8 ± 0,2	0,42 ± 0,06	4,8 ± 0,2	4,8 ± 0,2	4,8 ± 0,2
Концентрация морской соли, г/дм ³	240	240	120	120	120	120
Поверхностная освещенность, Вт·м ⁻²	200	80	80	200	80	80
Температура, °С	35	28	28	28	35	28
Дополнительные элементы минерального питания	N, P, МЭ	×	N, P, МЭ	×	×	×

Примечание. МЭ — микроэлементы; «×» — элементы минерального питания не добавляли.

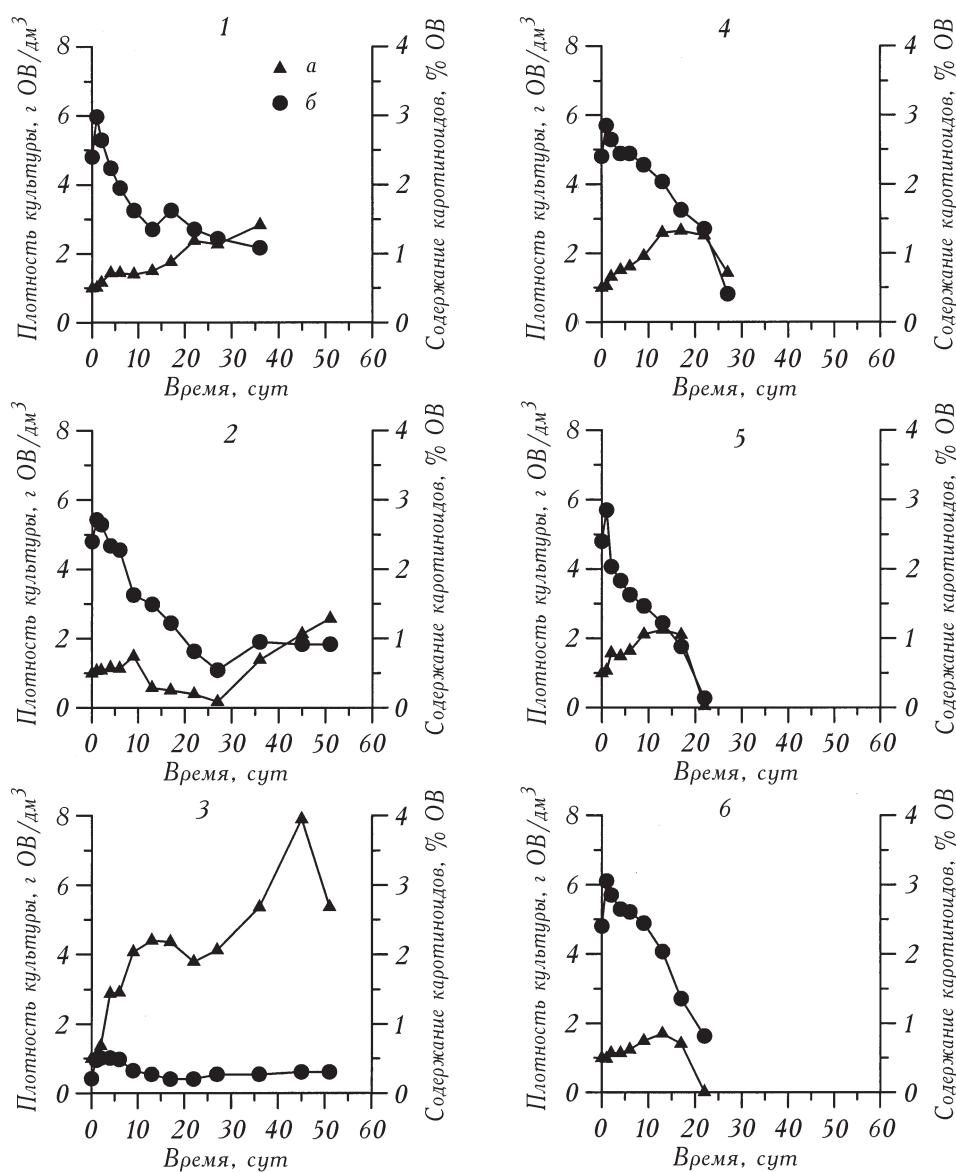
водорослей ацетоном. Спектры экстрактов пигментов промеряли на регистрирующем спектрофотометре СФ-2000 в диапазоне длин волн 400— 800 нм с шагом 0,1 нм. Расчет концентраций пигментов проводили по формулам, предложенным [26], по значениям оптической плотности на длинах волн, соответствующих максимумам поглощения пигментов.

Рассчитывали средние арифметические (\bar{x}), стандартные отклонения (S), основные ошибки средних, доверительные интервалы для средних ($\Delta\bar{x}$). Все расчеты проводили для уровня значимости $\alpha = 0,05$. В таблицах и на графиках представлены средние значения и рассчитанные доверительные интервалы ($\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$).

Результаты исследований и их обсуждение

На второй стадии культивирования (варианты 1, 2, 4—6) первоначальная плотность культуры составляла 4,8 г ОВ/дм³. Динамика плотности культуры для вариантов 4—6 была сходной: плотность культуры резко снижалась, и на 22—26-е сутки наблюдалась гибель культуры. Для варианта с повышенной концентрацией морской соли (№ 2) плотность культуры микроводорослей также уменьшилась к 26-м суткам, а затем наблюдалась ее стабилизация на уровне около 2 г ОВ/дм³. Стабилизация этого параметра в эксперименте наблюдалась также для варианта с минимальной первоначальной плотностью культуры (№ 3), где к 26-м суткам его значение составило 0,40—0,45 г ОВ/дм³ (рис. 1).

Для оценки особенностей накопления пигментов *D. salina* при воздействии стрессовых факторов, помимо определения ростовых показателей, исследовали динамику содержания каротиноидов в биомассе водоросли. На данном этапе для вариантов 4—6 первоначально наблюдали устойчивый рост относительного содержания каротиноидов (в 2—2,5 раза), а затем оно резко снижалось, что было обусловлено гибелью культуры (см. рис. 1).



1. Динамика содержания суммарных каротиноидов (а) и плотности культуры (б) *Dunaliella salina* на второй стадии накопительного культивирования микроводоросли: 1—6 — варианты эксперимента.

Для вариантов 1 и 2 наблюдалось постепенное повышение относительного содержания каротиноидов и их максимальная концентрация не превышала 1,4% ОВ (табл. 2).

Наиболее значительное увеличение относительного содержания каротиноидов наблюдалось для варианта 3, главным отличием которого от остальных вариантов была повышенная освещенность клеток за счет разбавления культуры в 10 раз. Именно этот фактор вызвал резкое увеличение содержа-

2. Относительное содержание каротиноидов в эксперименте по индукции каротиногенеза в культуре *Dunaliella salina*

Варианты	Содержание каротиноидов, % ОВ		
	13-е сутки	36-е сутки	51-е сутки
1	0,8 ± 0,1	1,4 ± 0,2	—
2	0,3 ± 0,1	0,7 ± 0,1	1,3 ± 0,1
3	2,2 ± 0,02	2,7 ± 0,2	2,7 ± 0,2
4	1,3 ± 0,1	—	—
5	0,9 ± 0,05	—	—
6	1,1 ± 0,1	—	—

П р и м е ч а н и е. Во всех вариантах содержание каротиноидов на начало эксперимента было одинаковым и составляло $0,5 \pm 0,04\%$ ОВ.

ния каротиноидов. На 45-е сутки их количество достигло максимальных значений в данном эксперименте — около 4% ОВ (см. рис. 1).

К настоящему времени большинство исследователей придерживаются той точки зрения, что накопление β -каротина, как защитного агента, вызывается повышенной продукцией свободных форм кислорода и других радикалов. Высокая скорость образования свободных радикалов, в свою очередь, вызывается стрессовой интенсивностью воздействия каких-либо факторов среды при дефиците минерального питания [11]. Стресс нарушает естественные биосинтетические процессы в клетках микроводоросли и приводит к переключению клеток на синтез защитных веществ (β -каротина и др.), поскольку световое обеспечение клеток остается, как правило, высоким, что позволяет синтезировать новые вещества.

Исследователи использовали стрессовые факторы различной интенсивности и их комбинации для индукции гиперсинтеза β -каротина у *D. salina*, но основными признаны: дефицит элементов минерального питания, повышенный уровень освещенности и солености [6, 8, 10, 16, 18, 22, 23]. Показана возможность получения β -каротина на уровне 7% СВ при начальном его содержании 0,5% СВ в условиях увеличения освещенности в 200 раз и дефицита минерального азота в среде, при сохранении начальных температуры и солености [23]. Повышение солености в 2,5 раза, снижение температуры до субоптимальных 15°C приводило к накоплению β -каротина на уровне 2—4% СВ. Значительного повышения относительного содержания β -каротина добивались и увеличением солености среды [8].

Необходимо отметить, что дефицит элементов минерального питания сопровождается снижением роста микроводорослей (вплоть до их гибели), но благоприятствует накоплению β -каротина [6, 8, 16, 23]. Это подтверждается результатами, полученными в вариантах № 4—6, где наблюдали гибель культуры через 3—4 недели после начала эксперимента. В культиваторах с повышенной концентрацией соли и 10-кратным разбавлением культура сохранялась в течение двух месяцев. Это свидетельствует, по-видимому, об адапта-

ции культуры в этих двух вариантах к заданным экстремальным условиям среды, что позволило сохранить накопительную культуру в активном состоянии на протяжении всего опыта.

Показано, что действие стрессовых факторов вызывает накопление β -каротина, но в различной степени (см. табл. 2, рис. 1). Если считать оптимальной и наиболее эффективной комбинацию действующих факторов, приводящую за минимальный временной интервал к максимальному выходу β -каротина при выращивании дуналиеллы, то самым неэффективным оказалось повышение солености (вариант № 2). На 13-е сутки эксперимента данный фактор вызывал снижение содержания β -каротина на 40% от начального. Для того, чтобы содержание каротиноидов в клетках дуналиеллы в этих условиях достигло уровня контрольного варианта на 13-е сутки опыта, потребовалось еще более месяца. При воздействии субоптимальной температуры (№ 5) и всего комплекса исследуемых факторов (№ 1) на 13-е сутки эксперимента содержание в клетках β -каротина увеличилось соответственно на 80 и 60% от первоначального, но от контроля отличалось незначительно.

В опыте увеличивали освещенность клеток *D. salina* двумя способами: повышали поверхностную освещенность культиваторов и разбавляли культуру. Удельная пространственная освещенность клеток при разбавлении культуры была более чем в 4 раза выше, чем в первом случае. То есть, содержание каротиноидов в двух вариантах эксперимента (№ 3 и 4), где действующим фактором был свет, должно было отличаться. При повышении поверхностной освещенности (№ 4) содержание каротиноидов увеличилось в 2,6 раза. Наибольший рост содержания β -каротина (в 4,4 раза на 13-е сутки), по сравнению с начальным, отмечали в варианте с разведением культуры и добавкой следовых количеств солей, содержащих азот и фосфор (вариант № 3). В данном варианте опыта с 40-х по 50-е сутки культивирования относительное содержание β -каротина достигло 4% ОВ.

Значительное, по сравнению с другими вариантами, увеличение относительного содержания β -каротина в варианте с 10-кратным разведением культуры позволяет предположить, что ведущими факторами, вызывающими гиперсинтез β -каротина, как в экстенсивной культуре, так и в интенсивной, являются высокая освещенность и дефицит биогенных элементов. Общеизвестный факт, что высокая освещенность и наличие элементов минерального питания вызывают активный рост микроводорослей свидетельствует о том, что первичным фактором является дефицит биогенных элементов, а высокая освещенность — самым эффективным ускорителем процесса синтеза β -каротина. Если данное предположение является верным, то в дальнейших опытах повышение облученности, по сравнению с настоящим экспериментом, при дефиците минерального субстрата вызовет еще более высокое накопление каротиноидов.

Кроме относительного содержания целевого компонента, важнейшей характеристикой системы культивирования является выход по этому компоненту, или продуктивность. Выход каротиноидов на второй фазе двустадийной накопительной культуры *D. salina* (за первые 13 сут) в вариантах 1—6 составил соответственно 1,14, 0,49, 0,67, 2,97, 1,54 и 1,95 мг/дм³·сут. По-

лученные значения продуктивности для вариантов эксперимента № 1, 5 и 6 обусловлены, главным образом, довольно высокой плотностью культуры (около 2 г ОВ/дм³), в то время как для варианта с максимальным содержанием каротиноидов, но низкой плотностью культуры (№ 3), выход каротиноидов был в 2—3 раза ниже. В варианте эксперимента с повышенной соленостью среды (№ 2) получена самая низкая продуктивность культуры по каротиноидам, которая составила 25% от выхода в контроле, что свидетельствует о низкой эффективности данного фактора. Следует отметить, что снижение продуктивности обусловлено минимальным содержанием каротиноидов в клетках *D. salina*.

Наибольший выход по β-каротину (около 3 мг/дм³·сут), что выше контрольного в 1,5 раза, зафиксирован для варианта № 4 с наибольшей поверхностной освещенностью, что, однако, ниже потенциально возможного для данного вида [3]. Наибольший рост относительного содержания β-каротина зафиксирован в варианте с разбавлением культуры, который сопровождается снижением влияния метаболитов, содержащихся в культуральной среде, на клетки микроводоросли и повышением их средней пространственной освещенности. Более вероятно, что фактором, влияющим на индукцию каротиногенеза, является усиленное световое обеспечение, а не снижение влияния прижизненных выделений клеток. Таким образом, в дальнейшем необходимо проведение исследований накопления β-каротина в интенсивной культуре *D. salina* либо при более высокой степени освещенности, либо при перееде плотной культуры после первой стадии к более разбавленной.

Также необходимо отметить, что, когда культуру *D. salina* в 3-м варианте опыта разбавляли в 10 раз, по сравнению с другими вариантами, выход β-каротина составлял порядка 6 мг/дм³·сут (в пересчете на 1 дм³ исходной культуры), что в 2 раза выше, чем в варианте эксперимента с повышенной поверхностной освещенностью. Это позволяет использовать данный прием культивирования, при невозможности существенно увеличить поверхностную освещенность культиваторов, для получения биомассы *D. salina* с повышенным содержанием β-каротина.

Заключение

На примере двустадийной интенсивной накопительной культуры *D. salina* показано, что существенное влияние на накопление β-каротина оказывают высокая освещенность и дефицит биогенных элементов; тогда как повышение солености среды, температуры и экспозиции не имеют столь заметного эффекта. Экспериментально подтверждено, что наличие следовых количеств биогенных элементов на второй фазе двустадийного культивирования *D. salina* снижает потери биомассы и повышает выход β-каротина. Наибольшая продуктивность по β-каротину для исследованного вида реализуется при воздействии светового фактора на фоне лимита биогенных элементов.

**

Проведено порівняльну оцінку впливу різних фізико-хімічних факторів середовища на накопичення β-каротину в інтенсивній культурі Dunaliella salina. Показано пе-

реважаючий вплив світлового забезпечення над стресовою дією температури, солоності та експозиції на накопичення β -каротину.

**

*A comparative estimation of the influence of different physical and chemical factors on the accumulation of β -carotene in the intensive culture of *Dunaliella salina* was hold. The dominant influence the light stress to temperature, salinity and exposure time on the accumulation of β -carotene was shown.*

**

1. Абдуллаев А. А., Семененко В. Е. Интенсивная культура *Dunaliella salina* Teod. и некоторые ее физиологические характеристики // Физиология растений. — 1974. — Т. 21, вып. 6. — С. 1145—1153.
2. Бакланов А. Н., Чмиленко Ф. А. Получение бета-каротина (обзор) // Эко-технологии и ресурсосбережение. — 2000. — № 4. — С. 32—35.
3. Боровков А. Б. Динамика пигментов и роста микроводорослей в хемостате на примере *Dunaliella salina* Teod.: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Севастополь, 2008. — 28 с.
4. Гудвилович И. Н. Продукционные характеристики микроводорослей *Dunaliella salina* Teod. и *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross. при интенсивном культивировании: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Севастополь, 2011. — 25 с.
5. Ефремова Н. Разработка способов получения антиоксидантных препаратов на основе биоактивных веществ цианобактерий и микроводорослей: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. — Кишинев, 2009. — 29 с.
6. Комаристая В. П., Антоненко С. П., Ругась А. Н. Культивирование *Dunaliella salina* Teod. при субоптимальных концентрациях азота и фосфора и исключении их из среды // Альгология. — 2010. — Т. 20, № 1. — С. 42—55.
7. Лелеков А. С. Моделирование роста и биосинтеза морских микроводорослей в квазинепрерывной культуре: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Севастополь, 2009. — 26 с.
8. Масюк Н. П. Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода *Dunaliella* Teod. — Киев: Наук. думка, 1973. — 487 с.
9. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидро-биологической практике. — Киев : Наук. думка, 1975. — 247 с.
10. Семененко В. Е., Абдуллаев А. А. Параметрическое управление биосинтезом бета-каротина в клетках *Dunaliella salina* в условиях интенсивной культуры // Физиология растений. — 1980. — Т. 27, № 1. — С. 31—41.
11. Терентьева Н. В., Минюк Г. С., Дробецкая И. В., Чубчикова И. Н. Особенности вторичного каротиногенеза в вегетативных клетках *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae) при различных условиях минерального обеспечения // Мор. экол. журн. — 2008. — Т. 7, № 4. — С. 66—74.
12. Тренкеншу Р. П. Ростовые и фотоэнергетические характеристики морских микроводорослей в плотной культуре: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Красноярск, 1984. — 28 с.

13. Тренкеншу Р. П., Белянин В. Н. Влияние элементов минерального питания на продуктивность водоросли *Platymonas viridis* Rouch. // Биология моря. — 1979. — № 51. — С. 41—46.
14. Abd El-Baky H., El Baz F. K., El-Baroty G. S. Production of antioxidant by the green alga *Dunaliella salina* // Intern. J. Agri. Biol. — 2004. — Vol. 6, N 1. — P. 49—57.
15. Aharon O. A hundred years of *Dunaliella* research: 1905—2005 // Saline Systems. — 2005. — Vol. 1, N 2. — P. 1—14.
16. Ben-Amotz A. Effect of irradiance and nutrient deficiency on the chemical composition of *Dunaliella bardawil* Ben Amotz and Avron (Volvocales, Chlorophyta) // J. Plant. Physiol. — 1987. — Vol. 131. — P. 479—487.
17. Ben-Amotz A. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products — major industrial species — *Dunaliella* // Handbook of microalgal culture. — Oxford: Blackwell, 2004. — P. 273—280.
18. 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. — Vol. 91, N 3. — P. 1040—1043.
19. Borowitzka M. A. Microalgae as sources of fine chemicals // Microbiol. Sci. — 1986. — Vol. 3. — P. 5—372.
20. Garcia-Gonzalez M., Moreno J., Manzano J. C. et al. Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis- β -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor // J. Biotechnol. — 2005. — Vol. 115. — P. 81—90.
21. Giordano M., Beardall J. Impact of environmental conditions on photosynthesis, growth and carbon allocation strategies of hypersaline species of *Dunaliella* // Global Nest J. — 2009. — Vol. 11, N 1. — P. 79—85.
22. Gómez P., Barriga A., Cifuentes S., González M. Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* (strain CONC-007) and *Dunaliella bardawil* (strain ATCC 30861) Chlorophyta // Biol. Res. — 2003. — Vol. 36. — P. 185—192.
23. 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. — Vol. 106, N 4. — P. 638—648.
24. Mogedas B., Casal C., Forján E., Vilchez C. β -Carotene production enhancement by UV-A radiation in *Dunaliella bardawil* cultivated in laboratory reactors // J. Biosci. Bioeng. — 2009. — Vol. 108, N 1. — P. 47—51.
25. Ramos A. A., Polle J., Tran D. et al. The unicellular green alga *Dunaliella salina* Teod. as a model for abiotic stress tolerance: genetic advances and future perspectives // Algae. — 2011. — Vol. 26, N 1. — P. 3—20.
26. Wellburn A.R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution // J. Plant Phys. — 1994. — Vol. 144. — P. 307—313.
27. Zhu Y. H., Jiang J. G. Continuous cultivation of *Dunaliella salina* in photobioreactor for the production of β -carotene // Europ. Food Res. Technol. — 2008. — Vol. 227. — P. 953—959.