

УДК 581.1

УПРАВЛЕНИЕ ХИМИЧЕСКИМ СОСТАВОМ И ГАЗООБМЕНОМ КУЛЬТУРЫ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ПОСРЕДСТВОМ ФОРМИРОВАНИЯ ВОЗРАСТНОЙ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИИ

© 1995 г. Л. Н. Цоглин, А. Я. Акыев, Ю. М. Шапигузов, Г. Л. Клячко-Гурвич

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской Академии наук, Москва

Поступила в редакцию 27.10.94 г.

На основе полученных ранее данных по изменению в цикле развития характеристик клетки *Chlorella* IPPAS C-1 (*Chlorella* sp. K) показана возможность увеличения продуктивности культуры, изменения состава биомассы и выхода отдельных ее компонентов посредством направленного формирования возрастной структуры популяций при интенсивном культивировании в турбидостатном режиме. Проведены расчеты для четырех различных возрастных распределений клеток в культуре, которые свидетельствуют о возможности увеличения продуктивности по биомассе в 1.44 раз и изменения фотосинтетического коэффициента культуры в широких пределах. Процесс управления возрастным составом культуры приводит к изменению возрастного распределения клеток в урожае, что, в свою очередь, меняет химический состав биомассы. При этом по сравнению с режимом без управления возрастным составом, в биомассе урожая содержание белка может быть изменено в диапазоне от 0.69 до 1.27 раза, углеводов – от 0.68 до 1.24 раза, липидов – от 0.86 до 1.07 раза, а общий выход этих соединений (произведение их содержания на продуктивность культуры), меняется в пределах: белки – от 0.93 до 1.22 раза, углеводы – от 0.65 до 1.76 раза, липиды – от 0.95 до 1.44 раза. Предложены способы управления возрастным составом популяций, основанные на полном или частичном выведении из культиватора “старых” клеток с повышенным седиментационным коэффициентом.

Chlorella – популяция – возрастной состав – продуктивность – химический состав биомассы

Изменение функциональной активности организмов в течение их жизненного цикла – общебиологическая закономерность. В хозяйственной деятельности при культивировании многолетних высших растений и животных человек учитывает эту закономерность и формирует оптимальную возрастную структуру популяции. При этом, как правило, ставится цель оптимизации по выходу нужного продукта при условии непрерывности или периодичности (сезонности) процесса.

Существенные изменения функциональной активности хлоропласта и метаболизма в жизненном цикле микроводорослей также создают возможности повышения продуктивности культур и управления химическим составом биомассы.

Ранее [1] было показано, что параметры популяции, такие как скорость выделения кислорода, прирост биомассы, содержание различных элементов в биомассе можно представить в виде выражения:

$$F = N \int_0^T f(t)n(t)dt,$$

в котором F – искомая характеристика культуры,

Адрес для корреспонденции: Цоглин Лев Наумович. 127276, Москва, Ботаническая ул., 35. Институт физиологии растений РАН.

N – общая численность клеток популяции, T – длительность жизненного цикла клетки, n – плотность распределения клеток разного возраста, f – зависимость соответствующей характеристики клетки от ее возраста, t – возраст клетки (время от появления автоспоры до текущего момента).

Из приведенного выражения видно, что управляя параметром $n(t)$, можно изменять характеристики культуры, а значит качественный состав продукта и эффективность использования энергии.

Чтобы оценить те преимущества, которые может дать управление возрастным составом популяций микроводорослей, и реализовать их, необходимо знать особенности развития и метаболизма клетки в жизненном цикле – $f(t)$ и иметь методы формирования популяций с заданной возрастной структурой. В настоящее время накоплено достаточно экспериментальных данных, которые могут служить основой для такой работы.

Исследования жизненного цикла микроводорослей с использованием синхронных культур были начаты уже более полувека назад, и существует большой массив данных, полученных различными исследователями для разных культур [2 - 5]. Основной особенностью одноклеточ-

ных зеленых водорослей, которую отмечают все авторы, является существование в жизненном цикле клеток двух резко отличающихся стадий — световой и светонезависимой. На световой стадии происходит развитие фотосинтетического аппарата и хлоропласта, интенсивное накопление биомассы. На светонезависимой стадии в клетке протекают процессы, не требующие энергии света; происходит репликация ДНК, деление ядра, хлоропласта, самой клетки и образование автоспор. Фотосинтетическая активность клетки на этой стадии значительно снижена, даже в условиях освещения.

Для производства биомассы микроводорослей наиболее перспективным является проточное культивирование в контролируемых условиях с непрерывным отбором клеток в урожай и добавлением свежей питательной среды в культиватор.

В данной работе проведена оценка изменения продуктивности культуры *Chlorella*, фотосинтетического коэффициента (отношения скорости выделения O_2 к скорости поглощения CO_2), химического состава биомассы урожая и валового выхода белка, углеводов и липидов при непрерывном проточном культивировании в условиях формирования четырех различных возрастных структур популяции.

МЕТОДИКА

Расчеты проводили, используя данные (рис. 1), полученные ранее на синхронной культуре *Chlorella* IPPAS C-1 (*Chlorella* sp. K) по изменению характеристик клетки в цикле развития [6 - 8]. Кривые удельных скоростей выделения кислорода и поглощения CO_2 на рис. 1 представлены в относительных единицах так, что значение "1" фотосинтетического коэффициента соответствует точке пересечения этих кривых, то есть моменту, когда фотосинтетический коэффициент клетки в цикле развития становится равным единице. Значения выбранных параметров для каждой возрастной группы получали как произведение относительной численности и величины этого параметра у клеток данного возраста. Под возрастом клетки подразумевается временной период от автоспоры до текущего момента. Поскольку длительность клеточного цикла зависит не только от культуры, но и от условий культивирования, возраст клетки также представлен в относительных единицах, где за единицу принята длительность клеточного цикла. Расчеты проводили для режима проточного культивирования без управления и для трех различных вариантов управления возрастным составом популяций. Последовательность расчетов была следующей. Произведение относительной численности клеток определенного возраста на среднестатистическое значение биомассы клетки в этом возраст-

те определяет вклад клеток данного возраста в общее содержание биомассы в культиваторе. Таким образом, умножение значений возрастного распределения клеток с интервалами в 1 ч на значения биомассы клетки данного возраста дает кривую возрастного распределения биомассы клеток в культиваторе. В свою очередь, умножение значений возрастного распределения биомассы на параметры клеток разных возрастов (фотосинтетическая активность и содержание компонентов биомассы) дает кривые возрастного распределения каждого из выбранных параметров в популяции. Суммарные значения параметров всей культуры получены как интеграл от рассчитанных кривых. Аналогичные расчеты проведены для определения биохимического состава урожая. Данные расчетов представлены в относительных единицах, при этом за единицу приняты значения параметров для автоспоры.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Максимальная продуктивность микроводорослей достигается при турбидостатном (с поддержанием постоянной концентрации биомассы) режиме культивирования. При этом в установившемся состоянии возрастное распределение клеток как в культиваторе, так и в урожае носит экспоненциальный характер (рис. 2а, кривая 1) с показателем экспоненты, равным удельной скорости размножения культуры в данных условиях — μ . При непрерывном турбидостатном культивировании может быть реализован режим управления возрастной структурой популяции за счет центробежных сил [9] с выводом из культиватора всех или части клеток, достигших светонезависимой



Рис. 1. Изменение характеристик клетки *Chlorella* IPPAS C-1 в онтогенезе [6].
1 — рост биомассы клетки, 2 — удельная скорость прироста биомассы и поглощения углекислого газа, 3 — удельная скорость выделения кислорода, 4 — фотосинтетический коэффициент.

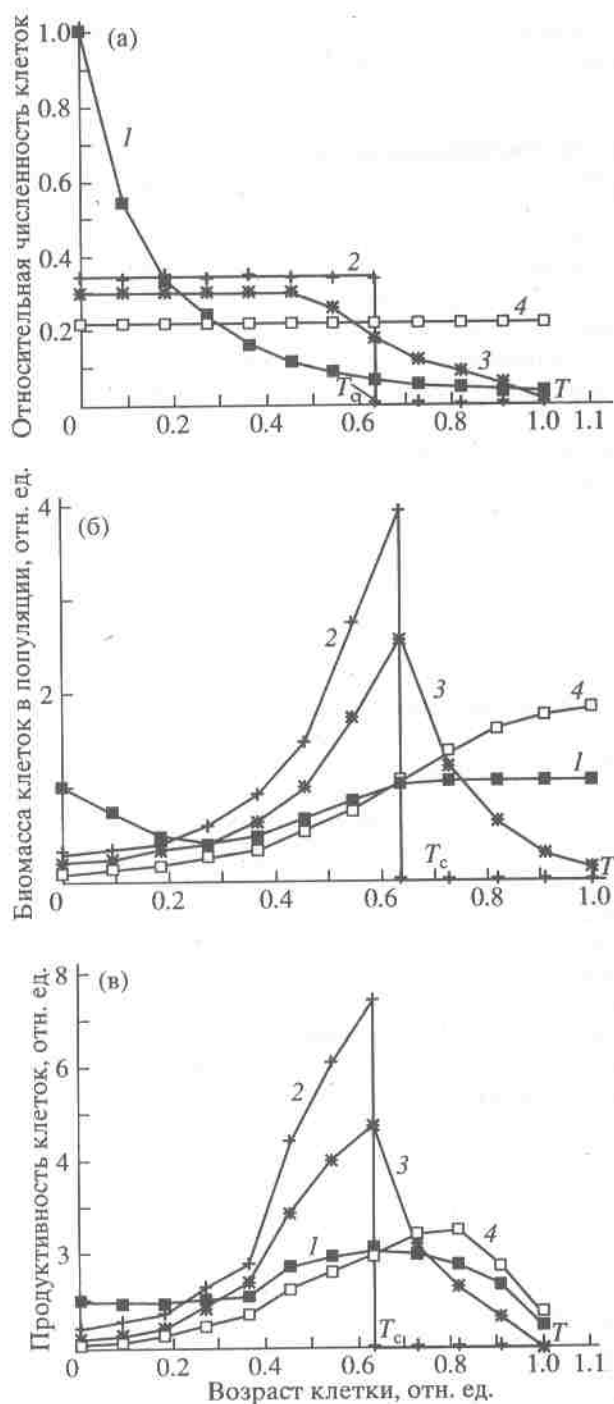


Рис. 2. Возрастное распределение клеток культуры (а), распределение суммарной биомассы клеток в зависимости от их возраста (б) и возрастное распределение продуктивности (площадь под каждой кривой соответствует продуктивности культуры в целом) (в). 1 – без управления возрастным составом, 2 – при выведении из культиватора всех клеток, достигших светонезависимой стадии развития, 3 – при сохранении в культиваторе части делящихся клеток, обеспечивающих образование необходимого количества автоспор, 4 – при поддержании одинакового количества клеток всех возрастов. T_c – конец световой стадии развития клетки, T – конец клеточного цикла. Возраст клетки – отн. ед. (см. Методику).

стадии развития. Возрастная структура в зависимости от режима управления может быть сформирована в различных вариантах. На рисунке представлены кривые трех вариантов для условий идеального разделения клеток по возрастным фракциям (рис. 2а, кривые 2 - 4). Наложение этих кривых на динамику роста биомассы клетки в онтогенезе (рис. 1, кривая 1) дает распределение биомассы клеток в культуре в зависимости от их возраста для всех четырех случаев (рис. 2б).

Как видно из рисунка 2б (кривая 1), при отсутствии управления возрастным составом примерно половина биомассы культуры приходится на клетки, находящиеся на светонезависимой стадии развития с низкой фотосинтетической активностью (в интервале между T_c и T , где T_c – длительность световой стадии развития клетки, а T – длительность клеточного цикла). В свою очередь наложение представленных на рис. 2б кривых на динамику в клеточном цикле удельной скорости прироста биомассы (рис. 1, кривая 2) дает возрастное распределение продуктивностей (рис. 2в). При этом кривые построены с учетом условия одинаковой концентрации биомассы в культиваторе во всех четырех случаях. Продуктивность культуры в каждом варианте определяется интегралом продуктивностей каждого из возрастов, или площадью под соответствующей кривой. Подсчет площадей под нормированными кривыми показывает, что максимальное увеличение продуктивности в 1.44 раза можно получить в режиме с неполным выведением клеток, достигших светонезависимой стадии.

Режим управления возрастным составом одновременно с повышением продуктивности позволяет изменять фотосинтетический коэффициент культуры, что может быть важным для регулирования газового состава атмосферы в закрытых системах жизнеобеспечения. Такая возможность определяется изменением отношения скоростей выделения кислорода и поглощения углекислого газа в жизненном цикле клетки (рис. 1, кривая 4). Расчет, аналогичный предыдущему, показывает, что фотосинтетический коэффициент может быть изменен в пределах от 1 до 0.79. Как видно из рис. 1, существует возможность смещения фотосинтетического коэффициента культуры и в сторону, большую 1, для чего необходимо формирование в культиваторе популяции клеток в возрастном диапазоне от автоспор до 4 ч клеточного цикла. Однако такой режим приведет к существенной потере продуктивности культуры по выходу биомассы.

При управлении возрастным составом популяции в культиваторе в урожай отбираются преимущественно клетки, достигшие светонезависимой стадии развития, что приведет к изменению биохимического состава урожая по сравнению с

режимом выращивания без управления. Возрастное распределение биомассы клеток в урожае при выбранных режимах управления примет вид, представленный на рис. 3. Биомасса *Chlorella* IPPAS C-1 при интенсивном турбидостатном культивировании без управления возрастным составом содержит около 42% белка, 24% углеводов и 18% липидов. Принимая эти значения за 1 и проведя процедуру наложения динамики накопления компонентов клетки (рис. 4) на возрастное распределение биомассы в урожае для различных режимов управления, получим результаты, представленные в таблице, из которой следует, что химический состав биомассы в урожае может быть изменен в зависимости от режима управления возрастной структурой популяции.

За счет изменения возрастного распределения компонентов биомассы и скорости прироста биомассы при различных режимах управления суммарное количество белка в урожае меняется в пределах от 0.93 до 1.24 раза, углеводов – от 0.65 до 1.76 раза, липидов – от 0.95 до 1.44 раза. Расширить пределы изменений химического состава и выхода отдельных компонентов в урожае микроводорослей можно, по-видимому, за счет сочетания управления возрастным составом с экстремальными воздействиями на культуру, приводящими, как правило, к накоплению углеводов и/или липидов.

Таким образом, расчеты показывают, что управляя возрастным составом популяций *Chlorella*, в зависимости от задач культивирования можно увеличивать продуктивность культуры, выход отдельных компонентов биомассы или менять значение фотосинтетического коэффициента.

Рассмотрим теперь технологические возможности управления возрастной структурой популяций микроводорослей.

При проточном культивировании микроводорослей в установившемся режиме вероятность попадания в урожай клеток того или иного возрастного состояния пропорциональна их относительной численности в популяции. Принудительное изменение вероятности выхода из культиватора клеток определенного возраста приведет к установлению нового возрастного распределения в популяции. При этом длительность переходного периода будет определяться степенью изменения вероятности и скоростью протока. Например, при $\mu = 0.2 \text{ ч}^{-1}$ вероятность выхода в урожай клеток, находящихся на светонезависимой стадии развития, составляет 0.12. Увеличение вероятности до значения 0.25 приведет к возникновению через 4 - 5-клеточных циклов (44 - 55 ч) нового возрастного распределения в культиваторе, при котором относительная численность клеток на светонезависимой стадии развития уменьшится в 6 - 7 раз.

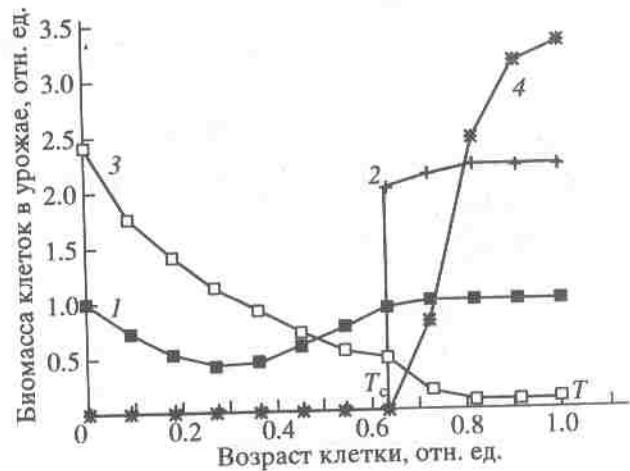


Рис. 3. Распределение биомассы клеток в зависимости от их возраста в урожае без управления (1) и при различных режимах управления возрастной структурой популяции (2 - 4). Обозначения см. рис. 2.



Рис. 4. Изменение биохимического состава клетки в онтогенезе [8].

Таким образом, процесс управления возрастным составом популяций микроводорослей заключается в изменении вероятности выхода в урожай клеток заданных возрастных групп.

Рассмотрим возможные варианты реализации управления возрастным распределением клеток в популяциях одноклеточных водорослей (рис. 5). К концу клеточного цикла значительно возрастает размер клеток и содержание в них углеводов, что обуславливает увеличение их седиментационных свойств. Это позволяет использовать гравитационные методы для разделения клеток по возрастным фракциям.

Наиболее полно возможности управления возрастным составом популяций могут быть реализованы при двухфазном культивировании

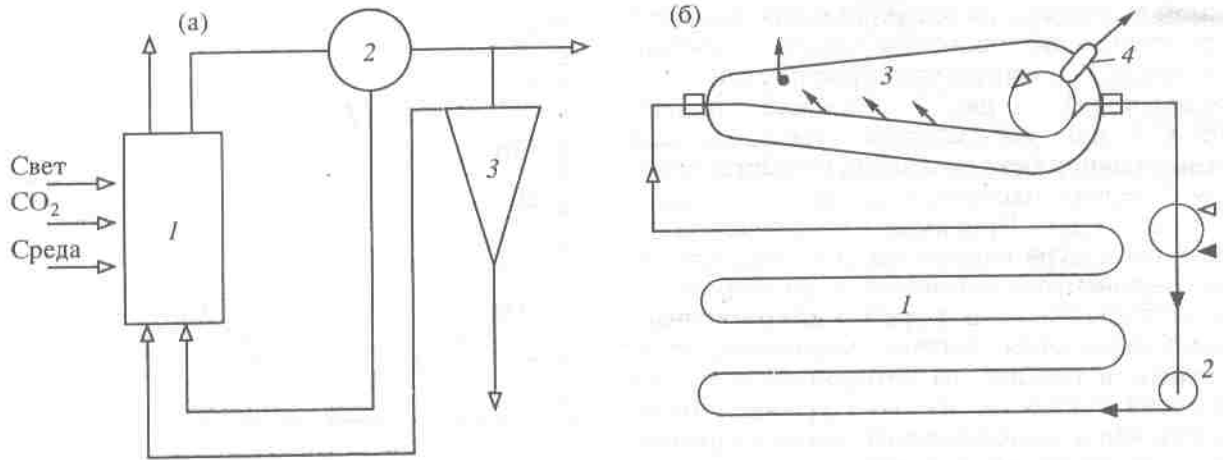


Рис. 5. Способы управления возрастным составом популяций микроводорослей. а – с применением добавочной емкости и возвратом в культиватор заданного числа автоспор; б – с непрерывным сепарированием суспензии.
На а: 1 – фотореактор, 2 – сепаратор, 3 – неосвещаемая емкость; на б: 1 – трубчатый реактор, 2 – насос, 3 – десорбер, 4 – трубка для отбора урожая.

микроводорослей (рис. 5а). Выращивание водорослей проводится в “активном” фотореакторе 1 при оптимальных условиях. После достижения заданной плотности культуры часть суспензии начинают непрерывно выводить из фотореактора через сепаратор 2. В сепараторе происходит разделение клеток на две фракции – преимущественно мелкие, “молодые” клетки и “старые”, в основном более крупные клетки. При этом режим разделения может регулироваться изменением ускорения (g), создаваемым сепаратором. Фракция более мелких клеток возвращается в фотореактор 1, а “старые” клетки поступают в неосвещаемую емкость 3. При выведении “старых” клеток из фотореактора в нем значительно сокращается численность делящихся клеток и уменьшается количество образующихся автоспор, что через некоторое время должно привести к остановке процесса культивирования. Для обеспечения непрерывности культивирования в темновой емкости обеспечиваются условия, не-

обходимые для деления клеток, и автоспоры в заданном количестве из верхней части темновой емкости возвращаются в фотореактор, а неподелившиеся клетки выводятся в урожай [10].

Более простой способ управления возрастным составом популяции микроводорослей разработан и реализован на полупромышленном фотореакторе трубчатого типа [11] (рис. 5б). Суспензия из трубчатого реактора 1 насосом 2 прокачивается через десорбер 3, где происходит выделение из суспензии микропузырьков газов и растворенных в ней газов, и одновременно суспензия закручивается за счет “гидравлического прыжка”. В зону вращательного движения суспензии введена трубка для отбора урожая 4. При этом с поверхности образующегося циклона в урожай выводятся преимущественно крупные клетки. Изменение глубины погружения трубки в зону вращательного движения суспензии позволяет управлять возрастным составом популяции в реакто-

Изменение продуктивности культуры по биомассе, содержания белка, углеводов, липидов в биомассе урожая и производительность по этим соединениям (произведение их содержания на продуктивность) при различных режимах управления возрастной структурой популяции. Показатели при режиме без управления приняты за 1

Режим управления возрастным составом	Продуктивность по биомассе	Содержание белка	Выход белка	Содержание углеводов	Выход углеводов	Содержание липидов	Выход липидов
2	1.35	0.69	0.93	1.24	1.67	1.07	1.44
3	1.44	0.78	1.12	1.22	1.76	0.86	1.23
4	0.98	1.27	1.22	0.68	0.65	0.97	0.95

Примечание. Режимы управления возрастным составом: 2 – при выведении из культиватора всех клеток, достигших светонезависимой стадии развития; 3 – при сохранении в культиваторе части делящихся клеток, обеспечивающих образование необходимого количества автоспор; 4 – при поддержании одинакового количества клеток всех возрастов (номер режима соответствует кривым на рис. 2).

Применение этого метода значительно (почти в 1.5 раза) повысило продуктивность реактора трубчатого типа.

Режим "мягкого" сепарирования суспензии *Scenedesmus* в течение светового дня был применен на промышленных установках в Болгарии [12] для оптимизации световых условий, что позволило повысить продуктивность на 30%.

Приведенные расчеты основаны на данных хорошо изученной культуры *Chlorella* IPPAS C-1. По-видимому, увеличение продуктивности и оптимизация выхода заданного продукта за счет управления возрастным составом популяций возможны и на других культурах, для чего необходимо знание закономерностей их роста и развития клеток в жизненном цикле.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Цоглин Л.Н. Анализ физиологических характеристик популяции микроводорослей на основе жизненного цикла и возрастного распределения клеток // Физиология растений. 1973. Т. 20. Вып. 3. С. 532.
2. Nichei T., Sasa T., Miyachi S., Suzuki K., Tamiya H. Change of Photosynthetic Activity of *Chlorella* Cell during the Cours of Their Life Cycle // Arch. Mikrobiol. 1954. V. 21. P. 155.
3. Kanazava T., Kanazava K., Kirk M.R., Bassam J.A. Regulation of Photosynthetic Carbon Metabolism in Synchronously Growing *Chlorella pyrenoidosa* // Plant and Cell Physiol. 1970. V. 11. № 1. P. 149.
4. Berkova E., Doucha J., Kubin S., Zachleder V., Setlik I. Variation in Photosynthetic Characteristics of *Scenedesmus quadricauda* during Cell Cycle // Abst. II Intern. Congr. on Photosynthesis, Stresa V. 3 / Eds Forti G. et al. The Hague: Dr. W. Junk, N.V. Publ. 1972. P. 2619.
5. Senger H. Quantum Yield of Photosynthesis in Synchronous Cultures of Algae // Proc. I Europ. Biophys. Congr. Baden near Vienna, 1971. P. 33.
6. Цоглин Л.Н., Клячко-Гурвич Г.Л. Изменение функциональной активности хлоропласта в клеточном цикле хлореллы // Физиология растений. 1980. Т. 27. Вып. 6. С. 1172.
7. Клячко-Гурвич Г.Л., Цоглин Л.Н., Можайцева Г.И. Обмен липидов в ходе онтогенеза хлореллы в связи с активностью фотосинтетического аппарата // Физиология растений. 1981. Т. 28. Вып. 2. С. 421.
8. Акыев А.Я., Цоглин Л.Н. Влияние кислорода на O₂-газообмен и на рост биомассы клетки в цикле развития *Chlorella* // Физиология растений. 1992. Т. 39. Вып. 3. С. 495.
9. Цоглин Л.Н., Семенов В.Е., Бакулин В.А. Способ культивирования микроводорослей: А.с. № 1130597 (СССР) // Б.И. 1984. № 47. С. 87.
10. Цоглин Л.Н., Бакулин В.А. Влияние возрастной структуры популяций на физиологические параметры и продуктивность культур микроводорослей // Физиология растений. 1977. Т. 24. Вып. 6. С. 1043.
11. Бакулин В.А., Горазеев Р.В., Михайлов Н.Г. Аппарат для выращивания микроводорослей: А.с. № 1013466 (СССР) // Б.И. 1982. № 15. С. 134.
12. Furnadzhieva S., Pilarsky P., Gabev A. Open Mass Algal Cultivation of Green Algae and Biomass Processing // Proc. I Eroup. Workshop on Microalgal Biotechnology, Potsdam-Rehbrucke, June 10 - 12. Potsdam-Rehbrucke, 1992. P. 93.

Представлено А.М. Носовым