

УДК 581.1.035+581.19

МАССОВОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ В ТЯЖЕЛОЙ ВОДЕ

**А. В. ЛАЗАРЕВА, М. С. ОКОН, В. П. КУТЫШЕНКО, Л. Н. ЦОГЛИН,
Л. П. КАЮШИН, В. Е. СЕМЕНЕНКО, Л. А. СИБЕЛЬДИНА,
Л. Н. ЧЕКУЛАЕВА**

*Институт биологической физики АН СССР, Пущино-на-Оке, Московской обл.
Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева Академии наук СССР, Москва*

В работе описаны особенности роста одноклеточной водоросли *Chlorella sp. K* в среде на D_2O и конструкция культиватора с замкнутым контуром циркуляции газовой смеси, обедненной по O_2 . Поддержание нужной концентрации CO_2 в системе и удаление выделяющегося при фотосинтезе O_2 производится автоматически. Культиватор обеспечивает производительность порядка 100 г (сухой вес) дейтерированной биомассы микроводорослей в сутки.

При изучении пространственных структур, конформационных превращений и природы взаимодействий белковых молекул методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса возникает необходимость в значительных количествах дейтерированных органических соединений. Практически единственным путем для полного изотопного замещения водорода на дейтерий служит фотосинтез микроорганизмов, преимущественно микроводорослей, способных развиваться в тяжелой воде.

Фотосинтетический способ получения дейтерированной биомассы связан в основном с двумя трудностями, в первую очередь длительной адаптацией микроорганизмов к условиям роста в тяжеловодородных средах. Вторая сложность заключена в технологии производства и в особых требованиях к конструкции культиваторов, которые должны исключать потери дорогостоящей тяжелой воды и не допускать снижения концентрации D_2O в питательных средах.

В работах [1—5] описываются различные пути адаптации и культивирования [5] микроводорослей в полностью дейтерированных средах. Однако специфика различных штаммов ставит каждый раз новые задачи и трудности.

Проведенная нами [6, 7] адаптация штамма *Chlorella sp. K* и изучение его свойств при выращивании в тяжелой воде продемонстрировали ряд положительных качеств этой формы, таких, как значительное содержание белка, хорошая производительность и устойчивость к бактериальному заражению, что остановило наш выбор на этом штамме для массового интенсивного культивирования в D_2O -среде. В настоящее время разработан и испытан при длительной эксплуатации культиватор с барботажным методом подачи углекислоты и замкнутым контуром циркуляции газа, обеспечивающий высокую надежность и производительность при культивировании микроводорослей в полностью дейтерированной (концентрация D_2O выше 99%) минеральной среды.

КОНСТРУКЦИЯ КУЛЬТИВАТОРА

На основании проведенных исследований ростовых характеристик *Chlorella sp. K* в D_2O -среде была разработана установка, общий вид которой представлен на рис. 1. В установке используется обедненная по кислороду газовая смесь из CO_2 и N_2 , циркулирующая по замкнутому контуру, что предотвращает потерю объема и изотопного обогащения D_2O .

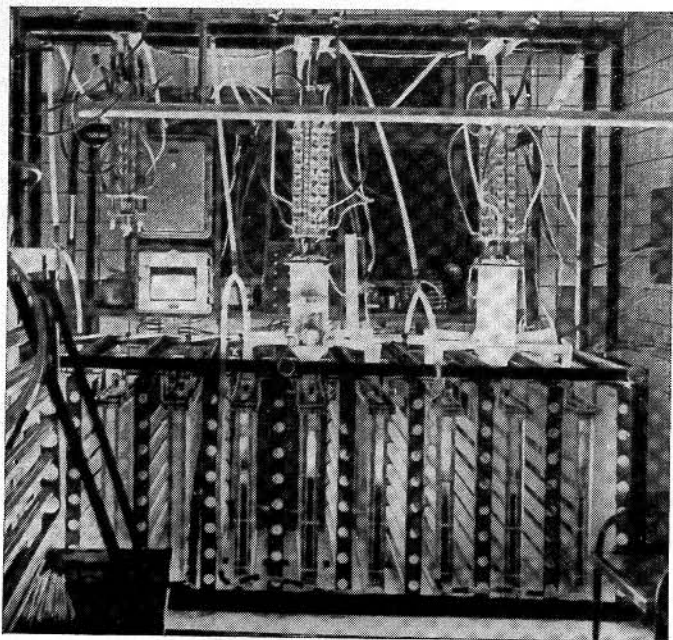


Рис. 1. Общий вид культиватора

среды. Культиватор состоит из 9 камер с плоскопараллельными стенками. Камеры чередуются с панелями люминесцентных ламп. Для упрощения схемы в один газовый контур включаются параллельно три камеры и культиватор, таким образом, состоит из трех независимых систем. Общий газовый объем такой системы равен 270 л. Камеры (1) выполнены из органического стекла (рис. 2), имеют размеры 1000·700 мм и толщину слоя суспензии 25 мм. Для облегчения очистки и стерилизации камер служит съемная верхняя крышка (2). На крышке, боковых стенках и дне камеры имеется ряд штуцеров: для введения барботеров (3), слива урожая (4), долива питательной среды (5), ввода в суспензию контактного термометра (6), выхода газовой смеси в пеноотбойник (7). Опыт эксплуатации показал, что культура микроводорослей на тяжелой воде отличается несколько повышенным пенообразованием при барботаже. По этой причине в пеноотбойник (8) введен электродвигатель (9) с крыльчаткой, полностью исключающий возможность выхода пены из культиватора. Нижняя часть пеноотбойника имеет конусную форму и заканчивается трубкой для стока пены обратно в камеру. Трубка опущена до середины камеры, заглушена снизу, а для возврата суспензии, захватываемой газом при барботаже, имеются боковые отверстия. Подобная конструкция препятствует попаданию в трубку пузырей газа, затрудняющих слив пены. Газовая смесь прокачивается воздуходувкой через барботеры (барботаж одновременно осуществляет функцию перемешивания суспензии) и после пеноотбойника и холодильника поступает обратно в контур циркуляции (рис. 3). Для приготовления нужной концентрации CO_2 в контур циркуляции газа включены две емкости. При заполнении одной

из них углекислотой, а другой азотом, в контуре образуется 6—9%-ная смесь CO_2 и N_2 . Бескислородная газовая смесь повышает интенсивность роста культуры [8, 9], и, как показали эксперименты, этот эффект сохраняется в D_2O -среде. Скорость прироста числа клеток возрастает примерно на 30%.

Уменьшение содержания углекислоты в газовом контуре, регистрируемое инфракрасным газоанализатором ОА-2209, позволяет судить об уровне фотосинтеза культуры. При снижении концентрации CO_2 до 2%.

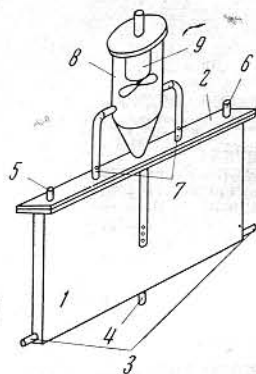


Рис. 2

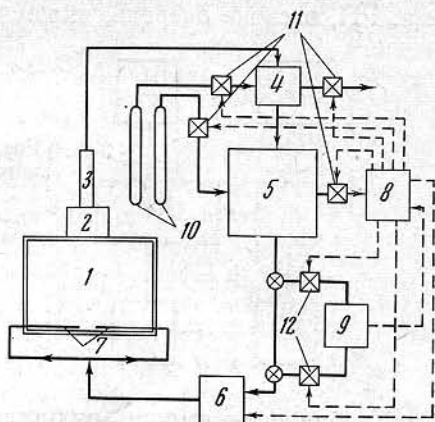


Рис. 3

Рис. 2. Конструкция камеры для культивирования микроводорослей 1—камера, 2—съемная верхняя крышка, 3—штуцеры для барботеров, 4—штуцеры для слива урожая, 5—штуцеры для долива свежей питательной среды, 6—штуцер для ввода контактного термометра, 7—штуцеры для выхода газовой смеси в пеноотбойник, 8—пеноотбойник, 9—электродвигатель с крыльчаткой

Рис. 3. Замкнутая система подачи газовой смеси с автоматическим управлением

1—камера, 2—пеноотбойник, 3—холодильник, 4—добавочная емкость, заполняемая CO_2 , 5—добавочная емкость, заполняемая N_2 , 6—воздуходувка, 7—барботеры, 8—система автоматического управления, 9—оптико-акустический газоанализатор CO_2 , 10—баллоны со сжатым CO_2 и N_2 , 11—клапаны продувки газовой смеси. Газовый контур на рис. обозначен сплошной линией, электрические связи — пунктиром

производится очередное заполнение емкости. Величина емкости выбрана такой, чтобы запас углекислоты в газовом контуре был достаточен для питания суспензии в течение нескольких часов. Продувка азотом большей добавочной емкости, составляющей примерно 90% общего газового объема, решает одновременно задачу удаления O_2 , выделяющегося в процессе фотосинтеза.

Стерилизация камер перед запуском системы производится 70%-ным этиловым спиртом. Газовый контур стерилизуется бактерицидными лампами при включенной циркуляции газа.

СИСТЕМА АВТОМАТИЧЕСКОГО РЕГУЛИРОВАНИЯ

Приготовление газовой смеси и удаление O_2 осуществляется системой автоматики, управляющим звеном которой является периодически включаемый в контуры каждой из систем оптико-акустический газоанализатор ОА-2209. Блок-схема системы автоматического регулирования представлена на рис. 4. В схему входят: газоанализатор (ГА), реле времени (РВ), реле анализа (РА), реле продувки (РП), блок электропневмоклапанов (БЭПК), пересчетная схема (ПС) и стабилизированный блок питания (на схеме не указан).

Система автоматики работает следующим образом: РВ через определенный временной интервал, который можно задавать соответствующим потенциометром, выдает сигнал на РА и затем выключается. РА, получив этот сигнал, включается на определенный промежуток времени, в течение которого идет анализ газовой смеси. Время анализа также может регулироваться. При включении РА вновь запускается реле времени и через газоанализатор на РП поступает сигнал. Если ГА показывает допустимое значение CO_2 в смеси, РП не включается, если концентрация CO_2 в системе мала, то сигналом от РА запускается РП на необходимое для продувки время. РП, в свою очередь, включает соответствующие клапаны в

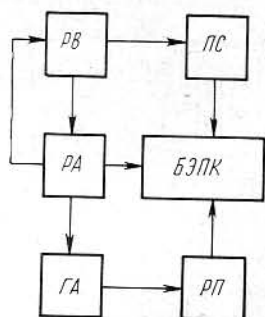


Рис. 4. Блок-схема системы автоматического регулирования

РВ — реле времени, РА — реле анализа, ГА — газоанализатор, РП — реле продувки, БЭПК — блок электропневмоклапанов, ПС — пересчетная схема

БЭПК и в добавочную емкость от баллона со сжатой углекислотой через редуктор поступает газ. При подаче CO_2 автоматически отключается воздуходувка. После перемешивания в контуре образуется смесь CO_2 в пределах от 6 до 9%.

В целях экономии газа продувка азотом большей добавочной емкости производится один раз в 4 цикла, что примерно соответствует одному разу в сутки. При этом в газовом контуре концентрация O_2 постепенно растет от величины, близкой к 0, до 10—15%. Поочередное включение ГА в каждую из систем осуществляется пересчетной схемой. Поскольку работа ГА требует осушки газа, то в целях уменьшения потерь D_2O подключение его к системам производится автоматически один раз в 3 часа. Время забора газовой смеси газоанализатором из каждой системы — 1—2 мин. Поскольку скорость продувки через ГА равна 0,5 л/мин, потери D_2O незначительны.

Контроль за работой системы автоматического регулирования и порядком включения узлов осуществляется с помощью системы сигнализации (на рисунке не указана).

РЕЖИМ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

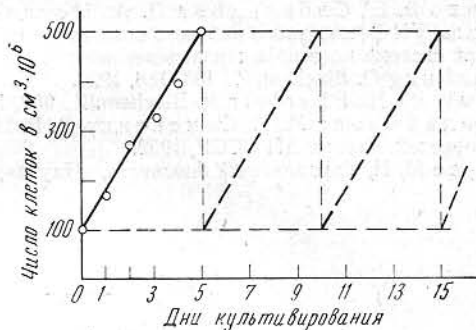
Культивирование ведется на тяжелой воде в питательной среде Тамия (см. работу [10]). Для уменьшения содержания H_2O в среде культивирования все соли перекристаллизовывались из D_2O . Тяжелая вода, на которой приготавливалась питательная среда, предварительно перегонялась [6].

В каждую из камер культиватора заливается 13 л суспензии, что составляет $\frac{3}{4}$ объема камеры. Неполная заливка улучшает условия барботаж и облегчает работу пеноотбойника. Общий объем культивируемой суспензии равен 117 л. Конструкция с чередованием камер и панелей люминесцентных ламп (в каждой панели включено по 7 ламп типа ЛБ-40) создает двухстороннее освещение с интенсивностью порядка $30\text{--}35 \cdot 10^3 \text{ эрг/см}^2 \cdot \text{сек}$ по всей поверхности камеры. Эта интенсивность света лежит на плато световых кривых фотосинтеза культуры, выращенной в D_2O [6, 7], благодаря чему по всей толщине слоя суспензии создаются световые условия роста микроводорослей, близкие к оптимуму. При тем-

пературе воздуха в помещении порядка 23—25° достигается необходимый температурный режим суспензии (36—38°) без дополнительного подогрева. В случае перегрева суспензии выше 38° предусмотрено автоматическое включение вентилятора от контактного термометра.

При применении такого дорогостоящего соединения, как тяжелая вода, проблема многократного использования питательной среды оказывается особенно актуальной. Возможность многократного использования центрифугата после культивирования микроводорослей в H_2O с корректировкой основных элементов питательной среды была показана ранее [11]. В среде с D_2O при повторном культивировании прирост биомассы замедляется и составляет только 200—250 млн клеток/см³ за 10 дней.

Рис. 5. Рост микроводорослей в D_2O -среде и режим культивирования



Очевидно, уменьшение интенсивности роста культуры при повторном культивировании в той же среде вызвано повышенным содержанием метаболитов, накапливающихся за первый цикл выращивания [11]. В связи с этим возникает необходимость очистки центрифугата для повторного многократного использования тяжелой воды. Обычная система перегонки в данном случае неудобна, так как центрифугат на тяжелой воде характеризуется сильным пенообразованием при нагреве. Нами была разработана установка для перегонки центрифугата. Установка представляет собой бак емкостью 40 л из нержавеющей стали, днище которого прогревается спиралью (мощность 1 кВт), а охлаждение осуществляется проточной водой через змеевик. Попадание пены в конденсатор предотвращается механическим пеноотбойником в виде лопастей, вращающихся со скоростью 3500 об/мин. Производительность установки 2 л/час. По ростовым характеристикам перегнанная D_2O не отличается от свежей.

Культивирование ведется в ступенчато-накопительном режиме с отбором урожая при плотности суспензии порядка $500 \cdot 10^6$ клеток в см³, что с учетом несколько увеличенного размера клеток в D_2O [6] составляет примерно 7 г сухой биомассы в литре. При достижении заданной плотности из каждой камеры сливается по 10 л суспензии и доливаема равный объем свежей питательной среды. После разбавления плотность суспензии в камерах понижается до $100 \cdot 10^6$ клеток в см³. Таким образом, рост суспензии, как показывает рис. 5, происходит на линейном участке, где культура имеет максимальную производительность. Среднесуточный прирост числа клеток составляет $75-80 \cdot 10^6$ клеток в см³ или 1 г биомассы (сухой вес) на литр. Вся система в целом обеспечивает получение 100—110 г (сухой вес) в сутки полностью дейтерированной биомассы микроводорослей.

Таким образом, описанная установка позволяет культивировать *Chlorella* в полностью дейтерированной среде с высокой фотосинтетической продуктивностью при автоматическом ведении процесса и обеспечивает фотобиосинтез широкого круга дейтерированных веществ, таких, как белки и аминокислоты, нуклеиновые кислоты и нуклеотиды, углеводы, липиды, органические и жирные кислоты, хлорофилл и каротиноиды и другие органические соединения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Moses V., Holm-Hansen O., Calvin M. *Biochim. et biophys. acta*, 28, 62, 1959.
2. Crespi H. L., Acrchen S. M., Katz F. F. *Nature*, 184, 729, 1959.
3. Chorney W., Scully N. F., Crespi H. L., Katz F. F. *Biochim. et biophys. acta*, 37, 280, 1960.
4. Crespi H. L., Rosenberg R. L., Katz F. F. *Science*, 161, 3848, 1968.
5. Daboll H. F., Crespi H. L., Katz F. F. *Biotechn. Bioeng.*, IV, 281, 1962.
6. Цоглин Л. Н., Семенов В. Е., Каюшин Л. П., Кутышенко В. П., Лазарева А. В., Окон М. С., Сибельдина Л. А., Чекулаева Л. Н. *Физиол. растений*, 20, 1204, 1973.
7. Каюшин Л. П., Кутышенко В. П., Лазарева А. В., Окон М. С., Семенов В. Е., Сибельдина Л. А., Цоглин Л. Н., Чекулаева Л. Н. Материалы VII Всесоюзного рабочего совещания по вопросу круговорота веществ в замкнутой системе на основе жизнедеятельности низших организмов. 26, Киев, 1972.
8. Warburg O. *Biochem. Z.*, 103, 188, 1920.
9. Kautsky H., Eberlein R. *Biochem. Z.*, 302, 137, 1939.
10. Владимиров М. Г., Семенов В. Е. Интенсивная культура одноклеточных водорослей. Изд-во АН СССР, 1962.
11. Таутс М. И. Управляемый биосинтез, «Наука», М., 145, 1966.

Поступила в редакцию
6.IV.1973.

MASS CULTIVATION OF MICRO ALGAE IN HEAVY WATER

A. V. LAZAREVA, M. S. OKON, V. P. KUTYSHENKO, L. N. ZOGLIN,
L. P. KAIUSHIN, V. E. SEMENENKO, L. A. SIBELDINA, L. N. CHEKULAEVA

Institute of Biological Physics, USSR Academy of Sciences, Pushchino-on-Oka
K. A. Timiriazev Institute of Plant Physiology, USSR Academy of Sciences, Moscow

The paper describes the growth of the unicellular alga *Chlorella* sp. K. in the medium with D₂O and presents the construction of the cultivator with a closed circuit of circulation of the gas mixture with a low content of oxygen. The required concentration of CO₂ in the system is maintained automatically as well as elimination of O₂ that is evolved in the course of photosynthesis. The cultivator produces ca. 100 g (dry weight) of deuterium-containing biomass of the microalgae per day.
