

*Д. С. Стехин, М. А. Еськова**

ВОПРОСЫ ИНТЕНСИФИКАЦИИ ПРОЦЕССА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Искусственные условия культивирования микроводорослей предполагают использование разных конструкций фотобиореакторов (ФБР). ФБР классифицируются по способу организации процесса культивирования: периодические и непрерывные. К периодическому культивированию преимущественно относятся емкостные ФБР, для создания непрерывного – трубчатые. Более точная классификация вовлекает в себя условия создания идеального массопереноса, теплопереноса и освещенности микроводорослей. ФБР подвержены улучшению, так как достижение идеальных условий культивирования возможно. Но наряду с конструкционными особенностями ФБР на процесс культивирования влияют физиологические особенности микроводорослей, а именно фотодыхание.

Цель: разработка технологии, позволяющая увеличить выход биомассы микроводоросли с нейтрализацией механизмов фотодыхания.

Фотодыхание (видимый фотосинтез, ВФ) – цикл поглощения O_2 , энергии и выходом CO_2 . Процесс замедляет истинный фотосинтез (ИФ). Происходит это из-за того, что микроводоросль обладает ферментом двойственной природы – РуБисКО.

* Работа выполнена под руководством д-ра техн. наук, проф. ФГБОУ ВО «ТГТУ» Д. С. Дворецкого.

Процесс фотодыхания затрагивает не только хлоропласты, являющиеся основным местом проведения темновых реакций (цикл Кальвина), но и пероксисомы и митохондрии.

РуБисКо (рибулозо-1,5-бисфосфат-карбоксилаза/оксигеназа) преимущественно захватывает CO_2 и осуществляет темновую фазу истинного фотосинтеза (ИФ), поставляя энергию к клетке микроводоросли и выделяя O_2 . Выделившейся O_2 не растворим в воде (4,9 мл/л) и скапливается в области клетки. Накопившийся кислород вокруг клетки микроводоросли блокирует поступление через белки переносчики клеточной мембраны CO_2 , поэтому микроводоросль поглощает часть O_2 , задействуя механизмы фотодыхания.

Оборот фермента РуБисКо с O_2 приводит к выделению CO_2 и затрате энергии, фермент в свою очередь разрушается с получением 3-фосфоглицерата.

Фосфогликолят (второй продукт захвата O_2) поступает в пероксисомы посредством реакции дефосфолирования, превращается в гликолат. Гликолат, так же как и РуБисКо, вступает в реакцию с O_2 , превращаясь в глиоксилат и выделяя в пероксисомы H_2O_2 . Перекись водорода разрушается под воздействием каталазы на H_2O и O_2 . Данная вода получила название биосинтетическая и, наравне с водой культуральной среды, может вовлекаться в процесс фотосинтеза или фотодыхания.

Определяющей частью фотодыхания является превращение глиоксилата в глицин с помощью глиоксилатглицинаминотрансферазы. Из двух молекул глицина синтезируется серин, CO_2 , NH_3 и восстанавливается НАД⁺.

Можно выделить факторы культивирования микроводоросли, влияющие на активацию механизмов фотодыхания [2]:

1. Отношение уровня CO_2/O_2 . При культивирования микроводоросли сложность создания в фотобиореакторе постоянного механического перемешивания заменяется барботированием объема жидкости. В большинстве случаев барботаж осуществляется подачей в среду атмосферного воздуха, содержащего 21% O_2 и 0,03% CO_2 [1, 2]. Так как поступающего O_2 в сотни раз больше, по сравнению с CO_2 , то микроводоросль вынуждена вовлекать механизмы фотодыхания, дабы получать энергию для роста и развития. Для подавления фотодыхания в данном случае, рекомендуется смешивать воздух с CO_2 , то есть подавать в культуральную среду смесь, содержащую CO_2 в размере 12...15% об. с атмосферным воздухом. Но рост и развитие микроводоросли имеет плато при достижении уровня CO_2 в 1000 ppm (parts per million) или 1 л/м³ жидкости.

2. Свет. Освещенность является основополагающим фактором для роста и развития микроводоросли в любых условиях. Чередование светового и темнового состояния – есть часть идеального культивирования микроводоросли. Процесс захвата O_2 идет только в темновых фазах, но исключение темнового периода пребывания микроводоросли приведет к другому отрицательному эффекту – фотоингибированию. Чувствительность клетки микроводоросли к O_2 находится в зависимости от изменения освещенности. Так при световом режиме с длиной волны 630 нм отношение скорости поглощения O_2 к скорости выделения составила 2,025. В световом режиме с длиной волны 710 нм данное соотношение составило 1,176. Рост и развитие клетки микроводоросли ингибируется освещенностью, превышающей 45 клк, и замедляется при понижении ниже 0,5 клк.

3. Температура. Для разных видов микроводоросли необходимо поддерживать свой температурный уровень, который будет подходить и для условий культивирования, и для нормальной жизнедеятельности микроводоросли. Диапазон варьируется от 20 до 38 °С. Температура оказывает влияние на чувствительность клетки к высокой интенсивности светового режима. Световосприятие повышается с повышением температуры. Также повышение температуры влияет на растворимость газов в жидкости. Так при 0 °С растворимость O_2 составляет 14,56 мг/л, а при 30 °С – 7,54 мг/л. Выделившийся кислород, в результате ВФ, повышает температуру на 2...4 °С, что является нежелательным обстоятельством при культивировании. Понижение температуры ниже 10 °С отрицательно сказывается на всем жизненном цикле микроводорослей. Но варьируя температурой можно получать биомассу, содержащую разного рода липиды, жирные кислоты. Это явление легло в основу создания стрессовых условий культивирования.

4. рН. Кислотность среды не является одинаковой для разных микроводорослей. Диапазон для оптимального роста и развития микроводоросли: *Chlorella vulgaris* 7,0...7,5; *Cyanium Caldarium* 1,5...2,0; *Dunaliella Salina* 6,0...7,5. При введении CO_2 в систему культивирования образуется буферный раствор с водой «бикарбонат–карбонат» $H_2O + CO_2 \rightarrow H_2CO_3 \rightarrow H^+ + HCO_3^- \rightarrow H^+ + CO_3^{2-}$. O_2 , в свою очередь, способствует увеличению скорости данного процесса, выступая окислителем и оказывает на клетку микроводоросли оксидативный стресс. Супероксид, как одна из реактивных форм кислорода, может повреждать клеточные компоненты, такие как липиды, белки и ДНК. H^+ , выделяющийся в реакции фотолиза H_2O , повышает кислотность

среды. Предотвращению повышения рН способствует ввод в культуральную среду буферного раствора фосфатов (БРФ). В жизненный цикл микроводоросли вовлечены щелочные металлы, такие как Na и K, которые нейтрализуют кислоты, образующиеся при данном явлении.

5. Макро- и микроэлементы питательной среды. Элементы, составляющие композицию питательной среды, подбираются в зависимости от конечного продукта, который будет получен. Для липидного состава необходимо соблюдение соотношения C:N = 15 – 20:1; для получения белковых комплексов и отдельных аминокислот – C:N = 1:15. Выделившийся O₂ снижает усвояемость углеродного компонента до 50%. Микроводоросль лучше захватывает углерод в виде растворенного CO₂, по сравнению с введением глюкозы в систему или создание искусственного буфера «карбонат–бикарбонат».

Одним из способов снижения интенсивности фотодыхания является химический. Применение сульфита натрия (Na₂SO₃) снижает концентрацию нерастворенного и растворенного O₂ в среде культивирования, по пути реакции $\text{Na}_2\text{SO}_3 + \text{O}_2 \rightarrow \text{Na}_2\text{SO}_4$, но при этом возможна активация у клетки микроводоросли чувствительности к кислотному остатку – SO₄²⁻, что способствует нарушению клеточного метаболизма и снижению скорости роста. В жизненном цикле микроводоросль применяет данный кислотный остаток в реакциях создания некоторых аминокислот, например метионин.

Перспективным направлением снижения эффекта фотодыхания является применение разделительных мембран [3]. Мембрана устанавливается на границе разделения жидкой и газовой фазы. Поры мембраны с номинальным размером пор 0,27 мкм и пористостью 76%. Применяется данный метод как в периодическом, так и в непрерывном культивировании. Основная проблема данного решения – загрязненность мембраны после 3–4 дней культивирования.

Обогащение газовой фазы органическим веществом (метан, пропан) посредством увеличения CO₂ из-за реакции $\text{C}_n\text{H}_m + \text{O}_2 \rightarrow n(\text{CO}_2) + m(\text{H}_2\text{O})$. Данный способ наилучшим образом снижает O₂ в среде культивирования, но увеличивающаяся концентрация CO₂ может вызвать ингибирующий эффект.

Снижение эффекта фотодыхания является актуальным вопросом для повышения скорости культивирования микроводорослей, повышения скорости выхода на стационарную фазу культивирования, снижения оксидативного стресса, оказываемого кислородом на клетку микроводоросли и приближения условий для течения идеального фотосинтеза.

Список литературы

1. **Birmingham, B. C.** Measurement of Photorespiration in Algae [Electronic resource] / B. C. Birmingham, J. R. Coleman, B. Colman. – URL : <http://www.academia.edu/12783321> (date of circulation : 08.09.2018) (In Russian)
2. **Appelberg, I.** Cultivation of freshwater microalgae in wastewater from a Swedish pulp and paper mill [Electronic resource] / I. Appelberg. – URL : <http://publications.lib.chalmers.se/records/fulltext/181289/181289.pdf> (date of circulation : 10.09.2018) (In Russian)
3. **Beltran A. B.,** Gravador D. C., O. WU MJ Evaluation of *Ankistrodesmus falcatus* for Bicarbonate-Based Integrated Carbon Capture System (BICCAPS) [Electronic resource]. URL : <https://doi.org/10.1051/mateconf/201815603016> (date of circulation : 09.09.2018) (In Russian)

Кафедра «Технологии и оборудование пищевых
и химических производств» ФГБОУ ВО «ТГТУ»