

*М. С. Темнов, Я. В. Устинская, М. А. Еськова,  
Н. А. Кокорев, К. И. Меронюк, И. В. Маркин\**

### **ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ НА ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА БЕЛКА**

Микроводоросли – это перспективное возобновляемое сырье для производства пищевых добавок, белковых напитков для людей, ведущих здоровый образ жизни, спортсменов и вегетарианцев, основ питательных сред и др. Количество белков и их аминокислотный состав может варьироваться в широких пределах, в зависимости от условий культивирования (тип питания, температура, уровень освещенности). Белки микроводорослей, в зависимости от условий культивирования, могут содержать различное соотношение заменимых и не заменимых для человека аминокислот.

В связи с этим целью исследования было определение закономерностей влияния условий культивирования микроводорослей штамма *Chlorella kessleri Fott et Nov C-9 (Parachlorella kessleri)*, полученного в Институте физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, на количественный и качественный состав белков биомассы (наличие аминокислот ВСАА (branched-chain amino acids – аминокислоты с разветвленными боковыми цепями).

Штамм микроводорослей *Chlorella kessleri Fott et Nov C-9 (Parachlorella kessleri)* культивировался в фотобиореакторе объемом 1,5 л при температуре 32 °С, уровне фотосинтетически активной радиации 150 мкмоль фотонов/(м<sup>2</sup>·с), аэрировании газовой смеси (70...80 л/ч) с содержанием углекислого газа на уровне 0,03% (об.) в автотрофных условиях на среде Тамия и в миксотрофных условиях на среде Тамия с добавлением глюкозы (5 г/л).

Подсчет клеток в суспензии осуществлялся методом прямого подсчета в камере Горяева [1, 2]. Концентрирование клеток осуществлялось в поле центробежных сил с использованием центрифуги Sigma 2-16 RK/2-16P в течение 8,5 мин при  $g = 1700$  (4000 об/мин). Клетки микроводорослей влажностью 99,8...99,9% (50 мл) разрушали с использованием СВЧ-генератора в течение 30 с при мощности излучения

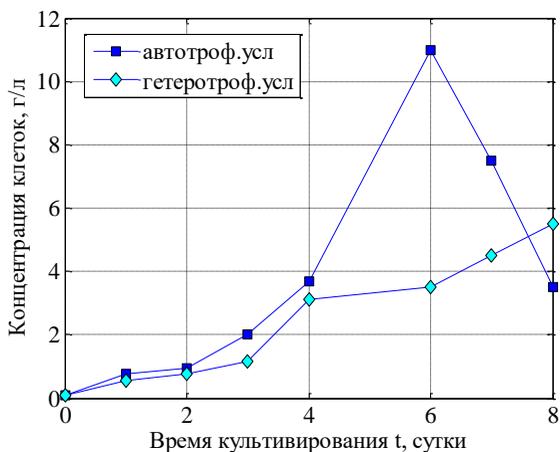
---

\* Работа выполнена под руководством д-ра техн. наук, зав. кафедрой «Технологии и оборудование пищевых и химических производств» ФГБОУ ВО «ТГТУ» Д. С. Дворецкого.

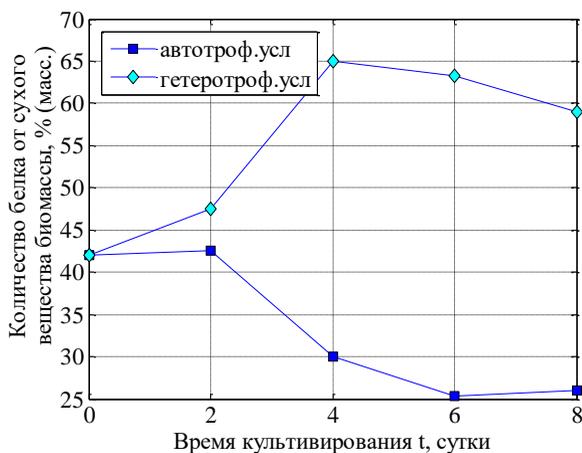
280 Вт (суспензия обрабатывалась три раза), при этом температура суспензии после воздействия СВЧ-излучения не превышала 65 °С. Экстракция белков осуществлялась фосфатно-буферным раствором (рН 7,4) – 100 мл экстрагента на биомассу (влажность 99,8...99,9%), сконцентрированную из 200 мл суспензии. Определение концентрации белка в экстракте осуществлялось спектрофотометрическим методом [3]. Определение содержания аминокислот ВСАА осуществлялось фотокolorиметрическим методом с использованием 1%-ного спиртового раствора нингидрина и 2 мл 0,05%-ного водного раствора аскорбиновой кислоты (стандарт – раствор ВСАА концентрацией 1 мкл/мл) [4].

Динамика роста клеток микроводорослей штамма *Chlorella kessleri* Fott et Nov C-9 (*Parachlorella kessleri*) в автотрофных и миксотрофных условиях представлена на рис. 1. Анализ кривых роста позволяет сделать вывод, что промежуток времени 0 – 2 суток характеризуется адаптацией культуры – перестройкой метаболизма в соответствии с созданными условиями культивирования. На 2 – 4 сутки наблюдается активный рост клеток, причем клетки, растущие в миксотрофных условиях, делятся активнее (3,7 г/л на 4 сутки), по сравнению с автотрофными клетками (3,1 г/л на 4 сутки). Эта тенденция сохраняется также на 4 – 7 сутки. Максимальная концентрация клеток, культивируемых в гетеротрофных условиях, наблюдается на 6 сутки культивирования и составляет 11 г/л, а в автотрофных условиях – на 8 сутки (5,5 г/л). Это объясняется тем, что в миксотрофных условиях наблюдается активное клеточное дыхание. Клетка обладает всеми необходимыми ресурсами, чтобы накопить биомассу. При этом наблюдается деградация хлоропластов по сравнению с клетками, растущими в автотрофных условиях. Это выражается в менее насыщенном цвете суспензии, культивируемой в миксотрофных условиях. В автотрофных условиях активны процессы накопления углеводов и жиров, синтезируемых в процессе фотосинтеза. Накопление запасных питательных веществ (углеводов и липидов) требует дополнительных затрат энергии, поэтому скорость размножения и концентрация клеток ниже.

Динамика накопления белков в клетках биомассы микроводорослей представлена на графике рис. 2. В гетеротрофных условиях максимальное количество белков в клетках наблюдается на 4 сутки культивирования и составляет 65% (масс.), далее количество белков уменьшалось, что можно объяснить истощением азотсодержащих соединений и глюкозы в питательной среде, что сказалось на активности гликолиза и процесса биосинтеза аминокислот ВСАА из пирувата.



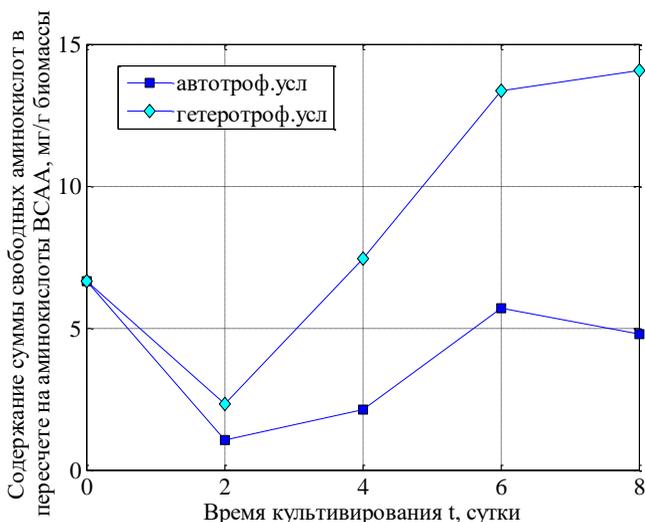
**Рис. 1.** Динамика роста клеток штамма *Chlorella kessleri* Fott et Nov C-9 (*Parachlorella kessleri*)



**Рис. 2.** Динамика накопления белков в клетках биомассы штамма *Chlorella kessleri* Fott et Nov C-9 (*Parachlorella kessleri*)

Содержание белков в биомассе, культивируемой в автотрофных условиях к 4 суткам культивирования, снижается на 29%, что можно объяснить тем, что в клетках осуществляется перестройка обмена веществ и повышение активности метаболических путей, связанных с биосинтезом липидов и углеводов.

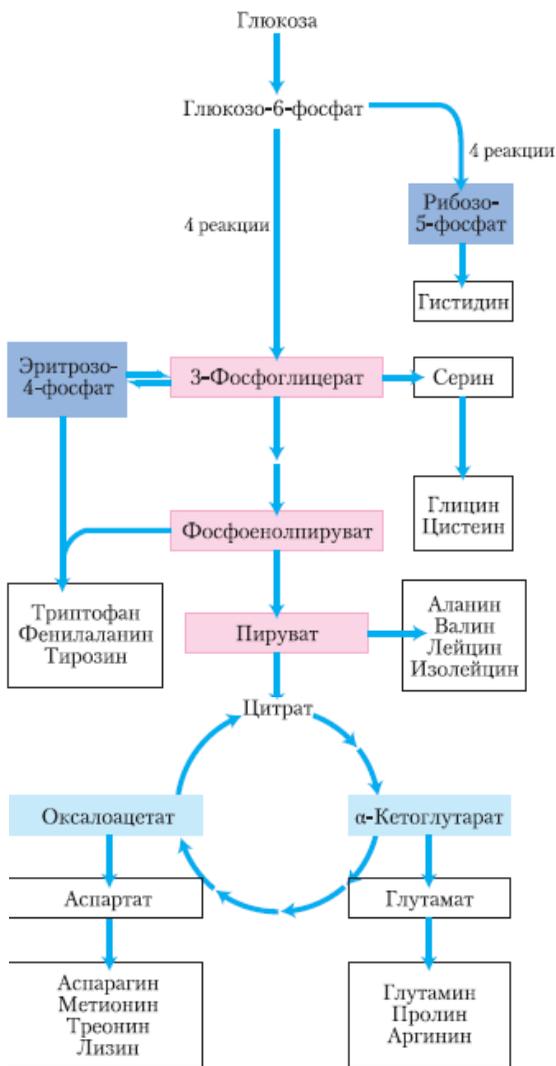
Важно отметить, что содержание аминокислот ВСАА в белках клеток, выращенных в гетеротрофных условиях, постоянно увеличивается и достигает величины 14 мг/г биомассы на 8 сутки (рис. 3), что объясняется высокой активностью процесса усвоения внесенной в питательную среду глюкозы (гликолиза), интермедиатом которого является пируват (рис. 4). Это соединение является предшественником аминокислот ВСАА (лейцина, валина и изолейцина) [5].



**Рис. 3.** Динамика накопления аминокислот ВСАА в клетках биомассы штамма *Chlorella kessleri* Fott et Nov C-9 (*Parachlorella kessleri*)

В автотрофных условиях процессы гликолиза и биосинтеза аминокислот ВСАА из пирувата менее активны (из-за меньшего количества глюкозы в клетках), поэтому содержание этих аминокислот в белках значительно ниже и составляет 4...5 мг/г биомассы, что в 2–3 раза ниже по сравнению с гетеротрофными условиями.

Активный синтез белков (до 65% (масс.)) и аминокислот ВСАА (14 мг/г биомассы) клетками микроводорослей штамма *Chlorella kessleri* Fott et Nov C-9 (*Parachlorella kessleri*) будет наблюдаться при достаточном количестве в клетке глюкозы и активном протекании процесса гликолиза – в миксотрофных условиях культивирования, при температуре 32 °С и уровне фотосинтетически активной радиации 150 мкмоль фотонов/(м<sup>2</sup>·с).



**Рис. 4. Схема биосинтеза аминокислот**

*Статья написана при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации – грант МК-2235.2020.8.*

## Список литературы

1. Владимирова, М. Г. Интенсивная культура одноклеточных водорослей / М. Г. Владимирова, В. Е. Семененко. – М. : Изд-во Акад. наук СССР, 1962. – 61 с.

2. Технология получения липидов из микроводорослей : монография / Д. С. Дворецкий, С. И. Дворецкий, М. С. Темнов и др. – Тамбов : Изд-во ТГТУ, 2015. – 100 с.

3. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии [Электронный ресурс] / ред. К. Уилсон и Дж. Уолкер ; пер. с англ. – 2-е изд. (эл.). – Электрон. текстовые дан. (1 файл pdf : 855 с.). – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015.

4. Разработка унифицированной методики количественного определения суммы свободных аминокислот в лекарственном растительном сырье и экстракционных препаратах / Т. И. Ярыгина, Г. И. Олешко, Е. В. Зорина, М. Д. Решетникова // Фармация. – 2011. – Т. 60, № 3. – С. 14 – 17.

5. Нельсон, Д. Основы биохимии Ленинджера : в 3 т. – Т. 2: Биоэнергетика и метаболизм / Д. Нельсон, М. Кокс ; пер. с англ. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. – 636 с.

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